



Title	ニホンウナギの催熟技術の高度化に関する研究
Author(s)	田中, 寿臣
Citation	北海道大学. 博士(水産科学) 甲第15122号
Issue Date	2022-09-26
DOI	10.14943/doctoral.k15122
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/87552">http://hdl.handle.net/2115/87552</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	Toshiomi_Tanaka.pdf



[Instructions for use](#)

ニホンウナギの催熟技術の高度化に関する研究

Studies on the advancement of the artificial  
maturation in the Japanese eel

北海道大学大学院水産科学院

海洋応用生命科学専攻

Division of Marine Life Science

Graduate School of Fisheries Sciences

Hokkaido Univeristy

田中 寿臣

Toshiomi Tanaka

2022 年

# 目次

第 I 章 緒言 .....	1
第 II 章 年級の異なる雌化ウナギにおける卵巢発達の周年変化 .....	7
1. 材料と方法 .....	8
1-1. 供試魚 .....	8
1-2. 卵径および生殖腺指数 (GSI) の測定 .....	8
1-3. TR-FIA による血中 11-ケトテストステロン (11KT) 量の測定 ....	9
1-4. 卵巢の組織学的観察 .....	10
1-5. 統計処理 .....	10
2. 結果 .....	11
2-1. 卵径の周年変化 .....	11
2-2. GSI の周年変化 .....	11
2-3. 血中 11-KT の周年変化 .....	11
2-4. 卵巢の組織学的観察 .....	15
3. 考察 .....	19
第 III 章 春季催熟技術の改善 .....	21
1. 材料と方法 .....	22
1-1. 供試魚 .....	22
1-2. 冬季蓄養環境条件 .....	22

1-3. 催熟前の卵径の測定と卵巢の組織学的観察 .....	22
1-4. 催熟 .....	24
1-5. 孵化実験 .....	25
1-6. 統計処理 .....	25
<b>2. 結果 .....</b>	<b>26</b>
2-1. 飼育水温変化 .....	26
2-2. 催熟前の卵径 .....	26
2-3. 孵化率 .....	28
2-4. 非成熟率 .....	28
2-5. 死亡率 .....	28
2-6. 採卵までの経過週数 .....	28
2-7. 催熟前の卵巢の組織学的観察 .....	31
<b>3. 考察 .....</b>	<b>33</b>
<b>第IV章 油球ステージ法の確立による催熟技術の高度化 .....</b>	<b>35</b>
<b>第1節 ニホンウナギ卵母細胞における油球の融合：ステージ分類と卵母細胞の最終成熟および排卵誘発のためのバイオマーカーとしての利用 ...</b>	<b>35</b>
1. 材料と方法 .....	37
1-1. 供試魚 .....	37
1-2. 催熟 .....	37

1-3. 孵化実験 .....	40
1-4. 卵母細胞と油球径の測定 .....	40
1-5. ステージ分類 .....	41
<b>2. 結果 .....</b>	<b>42</b>
2-1. 油球融合状態によるステージ分類 .....	42
2-2. 油球ステージと卵質の関係 (実験 1) .....	46
2-3. 極上卵獲得時の油球ステージ (実験 2) .....	48
<b>3. 考察 .....</b>	<b>52</b>
<b>第 2 節 飼育水温の調節がニホンウナギの卵母細胞の成熟の進行に及ぼす 影響 .....</b>	<b>55</b>
<b>1. 材料と方法 .....</b>	<b>57</b>
1-1. 供試魚 .....	57
1-2. 催熟 .....	57
1-3. 油球ステージの判定と卵母細胞径の測定 .....	58
1-4. 孵化実験 .....	58
1-5. 統計解析 .....	59
1-6. 水温による最終成熟速度の調節 .....	59
1-6-1. 成熟加減法による油球ステージと卵径の推移 .....	59
1-6-2. 各試験区の孵化率と油球ステージ .....	59

1-7. 油球ステージに応じた水温選択による最終成熟速度の調節 .....	60
1-7-1. ステージに応じた成熟加減法による油球ステージと卵径の推移 .....	60
1-7-2. 各試験区の孵化率と油球ステージの分布 .....	60
<b>2. 結果 .....</b>	<b>62</b>
2-1. 水温による最終成熟速度の調節 .....	62
2-1-1. 成熟加減法による油球ステージと卵径の推移 .....	62
2-1-2. 各試験区の孵化率と油球ステージ .....	68
2-2. 油球ステージに応じた水温選択による最終成熟速度の調節 .....	68
2-2-1. ステージに応じた成熟加減法による油球ステージと卵径の推移 .....	68
2-2-2. 各試験区の孵化率と油球ステージの分布 .....	74
<b>3. 考察 .....</b>	<b>76</b>
<b>第3節 油球ステージ法の完成 .....</b>	<b>80</b>
<b>1. 材料と方法 .....</b>	<b>82</b>
1-1. 供試魚 .....	82
1-2. 催熟 .....	82
1-3. 油球ステージの測定 .....	84
1-4. 孵化実験 .....	84
1-5. 統計解析 .....	84
<b>2. 結果 .....</b>	<b>86</b>

2-1. 水温 15℃で SPE を反復投与して比体重 120%になった時の油球 ステージの分布 .....	86
2-2. 油球ステージ 2 から 4 の個体が SPE 投与後水温 15℃で飼育した 場合の 1 週間後の油球ステージの分布 .....	86
2-3. 油球ステージ 5 の個体をプライミング後水温 15℃と 20℃で 24 時 間飼育した場合の油球ステージの推移と孵化率 .....	88
3. 考察 .....	90
第 V 章 総合討論 .....	93
第 VI 章 要約 .....	103
第 VII 章 参考文献 .....	109

## 第 I 章 緒言

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) は、日本の代表的な淡水養殖種である (Tanaka, 2015)。養殖に使用されるシラスウナギは、すべて天然で捕獲されたものである。養殖用シラスウナギの漁獲量は 1960 年代の年 200 トンから、2010 年代には盛時の 10 分の 1 以下まで急減した (Arai, 2014 ; 水産庁, 2015)。国際自然保護連合 (IUCN) は 2014 年、ニホンウナギを IUCN レッドリストの「絶滅危惧種」に分類した (Kaifu and Yokouchi, 2019)。シラスウナギの価格上昇は、養鰻業社や鰻屋などの関連産業の経営危機を招く (Tanaka *et al.*, 2006)。そのため、シラスウナギを人工的に生産する技術の開発が強く望まれている。

人工種苗生産のためには成熟した親魚を確保する必要があるが、ウナギは飼育環境下では性成熟せず、卵巣内の卵母細胞の発達は卵黄形成開始前後で停止する (Ijiri *et al.*, 1998; Kagawa, 2003 ; Kagawa *et al.*, 2005)。魚類の成熟は他の脊椎動物と同様に、主に脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモンによって制御されている (小林・足立, 2002 ; 小林・大久保・足立, 2013)。しかし、未熟なウナギの脳下垂体ではほとんど生殖腺刺激ホルモンが作られていないため、ウナギの卵黄形成を進行させ、性成熟を誘起するためには人為的なホルモン処理 (催熟) が不可欠であった (Ijiri *et al.*, 2011)。

ニホンウナギの催熟技術の開発は、1960 年代から行なわれ (日比谷, 1961 ; 石田・石井, 1970 ; Tanaka, 2015), 北海道大学の山本ら (1974) は雌の天然の下り (銀) ウナギにサケ脳下垂体摩砕物 (ホモゲネート) (SPH) を、雄の下りウナギおよび養殖ウナギにシナホリン (脳下垂体および胎盤性生殖腺刺激ホルモンを混合したホルモン剤) をそれぞれ



筋肉内に注射して得られた卵および精子を用いた人工授精により，世界で初めて人工孵化に成功し，孵化後 5 日間の発生を観察した (Yamamoto and Yamauchi, 1974)。さらに，同大学の山内らは 1976 年に孵化後 14 日間のプレプトセファルス幼生までの飼育成功を報告している (Yamauchi *et al.*, 1976)。しかし，当時の催熟法では，排卵直前までは進行するが排卵に至る個体は 1-2%で，排卵せずに過熟状態になることが非常に多かった。その後，Nagahama and Adachi (1985) は  $17\alpha,20\beta$ -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン (DHP) を魚類の最終成熟を誘起するステロイドホルモンとして世界で初めて同定した。この発見に従って，Yamauchi (1990) は，卵黄形成を完了したウナギに DHP を  $1 \mu\text{g/g-BW}$  で投与することによって高い確率で排卵を誘導させることに成功した。

一方，下りウナギを使った成熟誘導の研究では，親魚を入手することが非常に困難であったため，養殖ウナギを親魚として用いることが考えられたが，養殖ウナギは極端に雄が多く (松井, 1972)，また，外見では雌雄を見分けることはできないため，雌親魚の確保が大きな問題となっていた。そこで，愛知県水産試験場の Tachiki *et al.* (1997) は 80 年代後半から養殖魚を産卵用雌親魚として育成する技術開発に取り組み，1991 年に，シラスウナギに雌性ホルモン (エストラジオール- $17\beta:E_2$ ) を経口投与することで大部分を雌に分化させる方法を開発した。さらに，雌化ウナギを催熟して卵を得，孵化仔魚を得ることも成功した (立木, 1992)。その後，Ijiri *et al.* (1998) は，雌化ウナギが天然下りウナギと同様の確率で，催熟によって排卵まで誘導され

ることを報告し、雌化ウナギが大量安定供給可能な催熟用の雌親魚として非常に有用であることが示された。

その後、催熟法は改良が重ねられ、雌雄ともに安定して大量の配偶子を得ることができるようになった (Ohta and Izawa, 1996; Ohta *et al.*, 1996, 1997; Kagawa *et al.*, 1997, 1998)。具体的には、雌に対してはサケ脳下垂体抽出物 (SPE) を 20-40 mg/kg-BW の濃度で週 1 回腹腔内に連続注射することで卵黄形成を進行させ、2~3 か月後に最大卵群の平均卵径が 800  $\mu\text{m}$  前後に達した時点で、同濃度の SPE のプライミングを行ない、さらにその 24 時間後に DHP あるいはその前駆体の  $17\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン ( $17\alpha$ -OHP) を注射することで卵成熟および排卵を誘導している。同時に、雄に対しては、ヒト胎盤性生殖腺刺激ホルモン (hCG) の連続投与により精子形成および排精を促し、受精可能な精子を得ている。

さらに、アブラツノザメ卵 (*Squalus sp.*) を含む新規仔魚用飼料を用いて、レプトセファルス幼生の生産 (Tanaka *et al.*, 2001)、およびその後のシラスウナギへの変態 (Tanaka *et al.*, 2003) に成功した。そして、2010 年に本種の完全養殖に成功した (田中秀樹, 2010; Masuda *et al.*, 2012)。こうした努力にもかかわらず、卵からレプトセファルス期、シラスウナギ期までの生存率が非常に低いため、現在までシラスウナギは商業的に生産されていない (Tanaka, 2015)。シラスウナギの大量生産の阻害要因の一つとして、ホルモン処理により成熟を誘導した雌から得られた卵の質が不安定であることが挙げられる (Kagawa *et al.*, 2013; Kazeto *et al.*, 2019)。

卵質が安定しない原因の一つとして、親魚に用いられる雌化ウナギの卵巢が、天然下りウナギほどには発達していない (Ijiri *et al.*, 1998) ことが挙げられる。また、雌化ウナギが高年齢化すると催熟結果が悪くなることも経験的に分かっていた。ニホンウナギでは、催熟開始前の卵巢ステージが油球形成後期に達していない個体は、催熟処理しても成熟に至らないとされている (Ijiri *et al.*, 1998)。雌化ウナギでは、生殖腺指数 ( $GSI = \text{生殖腺重量} \times 100 / \text{体重}$ ) は周年に渡っておおむね 0.2 以下の極めて低い状態が続き、季節変化がみられる (Yoshikawa, 1995; Yoshikawa, 2012; Kagawa, 2003)。催熟季節が秋季よりも春季の方で不良卵が多いことも知られていた。さらに、未熟な雌ウナギを海水で長期間蓄養することで卵黄形成を促進可能である (Kagawa, 2003)。また、Ijiri *et al.* (1998) の結果により、SPH を用いてニホンウナギを催熟した際、その投与量が成熟率に顕著に影響することが報告されている。しかし、雌化ウナギをどのような環境で飼育し、どのように催熟するかを詳細に検討した例はなかった。従って、雌化ウナギを適切な環境で飼育し、卵母細胞を下りウナギ程度にまで発達させることができれば、その後の催熟における卵質改善に繋がることを期待できる。

催熟前の雌親魚の卵巢発達状況に加え、卵質悪化の最も大きな原因と考えられるのが、排卵誘発のためのホルモン処理のタイミングである。排卵誘発が早かったり遅かったりすると、授精後すぐに沈下する不良卵になることが示唆されている (Unuma *et al.*, 2005)。雌ウナギの成熟の進行を評価するための唯一の指標として、以前は比体重が用いられていた。また、比体重が一定値以上になると、排卵誘導のため

のホルモン投与や、産卵誘発のための成熟雄とのペアリングが行われていた (Sato *et al.*, 1992; Tachiki and Nakagawa, 1993)。当時は、雌の排卵率は高くなく、卵質も悪かった。Kagawa *et al.*, 1995 は、卵母細胞径と MIS (DHP) に対する反応性の関係を検討し、卵母細胞径 800  $\mu\text{m}$  を超えると MIS に反応して最終成熟・排卵する能力が高くなることを明らかにしている。この結果をもとに、卵母細胞径が 800  $\mu\text{m}$  を超えると、雌に対して SPE をプライミングする現在のプロトコルが開発された (Ohta *et al.*, 1997)。近年、種苗生産研究のためにニホンウナギを成熟させている機関では、この方法、または若干変更した方法が一般的に用いられている (Seoka *et al.*, 2003; Horie *et al.*, 2008; Okamura *et al.*, 2009; Chai *et al.*, 2010)。しかし、卵質はまだ不安定で、卵質が高い個体も認められるが、その他の多くの個体では非常に卵質が低い (Unuma *et al.*, 2004)。

適切なタイミングを把握するため、体重と卵径変化をチェックすることに加え、卵母細胞中の油球の数や大きさもよい指標になることも知られている。油球は最終成熟期に互いに融合するが、油球を指標として利用するためには、その融合の進行度ステージを段階的に詳細に分類することが有効と考えられる。卵質を向上させるためには、雌親魚の成熟状態を正確に把握し、最適なタイミングで排卵誘発処理を行なうことが前提条件となるが、本研究が始まる前には詳細に条件検討した例はほとんどなかった。

そこで、本研究では、ニホンウナギの催熟技術の高度化を目的として、第 II 章では、年級の異なる雌化養成ウナギにおける卵巣発達の周年変化を調べた。第 III 章では、春季催熟技術の改善を試みた。第 IV 章

では、油球ステージ法の確立による催熟技術の高度化を試みた。

本稿を進めるにあたり、本研究に終始御懇切なるご指導と激励をいただいた北海道大学足立伸次名誉教授，北海道大学大学院水産科学研究院井尻成保准教授に心から感謝致します。また，御多忙の中，数々の有意義な御助言，御教示をいただいた同大学院水産科学研究院都木靖彰教授，水田浩之教授に厚く感謝の意を表します。更に，実験に協力していただくとともに多大なご支援をいただいた国立研究開発法人水産研究・教育機構の鵜沼辰哉博士，田中秀樹博士（現近畿大学），風藤行紀博士，野村和晴博士に心から御礼申し上げます。最後に，実験に際し多大な御協力を頂いた，北海道大学淡水増殖研究室の松谷紀明氏（現青森県水産総合研究所），泉ひかり博士（現弘前大学）をはじめ，同研究室の皆様がこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

## 第II章 年級の異なる雌化ウナギにおける卵巢発達の周年変化

シラスウナギとして来遊したニホンウナギは、その後河川や汽水域で成長し、雄でおよそ4歳前後、雌ではおよそ7歳程度で性成熟を開始し、産卵場へ向かう。その時のそれぞれの体重は、雄で200~300g、雌は300g以上である。この大きさは、飼育下ではシラスウナギを池入れしてから1~2年で達する。これまで、催熟に用いる養成ウナギが高齢になると、良質卵を得にくくなることが経験的にわかっていた。しかし、その原因が卵巢の発達度合によるものかは不明であった。各研究機関で行われている催熟試験をみると、用いる雌化親魚の年齢にばらつきがみられた。これらの要因として、通常 of 養成ウナギではほとんどが雄になることが知られている中で、卵を得るために必要な雌には、シラスウナギ期からエストラジオール-17 $\beta$ を市販のウナギ用飼料に混合(10 mg/kg 飼料)し、6か月間給餌して雌化(Tachiki *et al.*, 1997)しなければならないという手間に加え、シラスウナギの価格高騰により毎年購入できないこと、雌化親魚が残っていれば、年齢に関係なくそこから使用して経費を削減するなどの背景があると考えられる。そこで本章では、催熟で使用する雌化ウナギは何歳が適当なのかを知るために、年級の異なる雌化ウナギにおける卵巢発達の周年変化を調べた。

## 1. 材料と方法

### 1-1. 供試魚

販売業者から 3～4 月に購入したシラスウナギに対し，エストラジオール-17 $\beta$ を市販のウナギ用飼料に混合（10 mg/kg 飼料）して 6 か月間給餌することにより雌化（Tachiki *et al.*1997）し，その後通常の市販飼料で年間飼育して雌親魚とした。

実験には養成 2 年目（平均体重 $\pm$ 標準誤差（以下，同じ）：553.1g $\pm$ 166.3 g），3 年目（920.4g $\pm$ 202.1 g），6 年目（1,216.6 $\pm$ 118.1 g）の雌化養成ウナギを用い，淡水，自然日長下のハウス内で淡水高温（水温 23～28 $^{\circ}$ C）飼育し，各年級群 7～9 尾を飼育水槽から任意に抽出し，サンプリングに供した。

### 1-2. 卵径および生殖腺指数（GSI）の測定

サンプリング時には，供試魚を 2-フェノキシエタノールで麻酔した後，体重を測定し，尾部静脈から約 0.5 mL 採血を行なった。その後卵巢を摘出して重量を測定し，生殖腺指数（GSI=生殖腺重量 $\times$ 100/体重）を求めた。

各個体から採取した卵巢組織をウナギ用リンゲル（NaCl 151 mM, KCl 3.3 mM, CaCl<sub>2</sub> 4.9 mM, MgCl<sub>2</sub> 3.5 mM, HEPES 10 mM, pH 7.4）で満たしたシャーレの中に入れ，一部はピンセットで卵濾胞を分離し，実体顕微鏡下で撮影した。残りの卵巢片はブアン氏液で固定した。卵濾胞の写真から 100 個分の卵径（壊卵は除外）をランダムに測定し，上位 20 個分の平均値を最大卵群卵径として求めた。一方，固定した卵巢片は組織学的に観察した。血液は 4 $^{\circ}$ C で一晩静置した後，4 $^{\circ}$ C，3500

rpm で 20 分遠心して血清を分離した。血清はホルモン分析まで $-30^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

### 1-3. TR-FIA による血中 11-ケトテストステロン (11KT) 量の測定

抗原固相化用緩衝液 ( $\text{NaHCO}_3$  4.2 g/500 mL-DW,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5.2 g/500 mL-DW, pH 9.3) であらかじめ 100 倍に希釈し、 $-30^{\circ}\text{C}$ で保存しておいた各ステロイドホルモンの BSA-ステロイド結合抗体 (BSA 抗原) 溶液を、抗原固相化用緩衝液で 2000 倍となるように調製した。この溶液を 96 穴マイクロタイタープレート (greiner bio-one) のウェルに 100  $\mu\text{L}$  ずつ分注し、 $4^{\circ}\text{C}$ で 18 時間静置することで各ウェルをコーティングした。その後、抗原をコートした各ウェルを洗浄液 (0.9%  $\text{NaCl}$ , 0.05 M  $\text{NaN}_3$ ) で 3 回洗浄した後、非特異反応を防ぐためブロッキング溶液 (0.1% BSA, 0.05 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3% Sucrose, 0.05%  $\text{NaN}_3$ ) を 200  $\mu\text{L}$  ずつ分注し、 $20^{\circ}\text{C}$  (室温) で 1 時間静置した。

そして、先の固相化およびブロッキング済みのプレートを用意し、ウェル洗浄液で 3 回洗浄した。アッセイ緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 0.6%  $\text{NaCl}$ , 0.05%  $\text{NaN}_3$ , 0.01% Tween40, 20  $\mu\text{M}$  Diethylenetriamine-N, N, N', N'', N''' – pentaacetic acid : DTPA, 0.1% BSA, pH 7.7~7.8) で各濃度 (0.024~50 ng/mL) に希釈したスタンダード溶液とアッセイ緩衝液を加えてよく攪拌し、測定試料をこのプレートに 25  $\mu\text{L}$  ずつ分注した。抗体をアッセイ緩衝液で希釈し、75  $\mu\text{L}$  ずつバックグラウンドを除く全てのウェルに注入し、 $4^{\circ}\text{C}$ で 18 時間静置した。反応後、ウェル洗浄液で 3 回洗浄し、ユーロピウム標識 IgG 抗体 (goat Eu-anti-rabbit IgG) をアッセイ緩衝液で 25 ng /ウェルに



調製し、100  $\mu$ L ずつ全てのウェルに分注した。20°C（室温）で1時間振とう後、ウェル洗浄液で3回洗浄した。その後、増強試薬（PerkinElmer Wallac 社）を100  $\mu$ L ずつ全てのウェルに分注し、5分間振とう後、マルチラベルカウンタ（1420 ARVO-D, Wallac 社）により613 nmの蛍光強度を測定した。

#### 1-4. 卵巣の組織学的観察

卵巣片をブアン氏液で2日間固定した後、70%エタノールで保存した。その後、エタノールで脱水後、常法に従いパラフィン包埋し、5  $\mu$ mの組織切片を作製した。切片作製後、ヘマトキシリン-エオシン染色を行ない、光学顕微鏡により観察した

#### 1-5. 統計処理

データは特に指定がない限り、平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。年級群間の差を調べるために、BellCurve for Excel version 2.0 (Social Survey Research Information Co., Ltd; Tokyo, Japan) を用いて、Kruskal Wallis 検定の後、Steel-Dwass 検定を実施した。統計的有意性は  $p < 0.05$  とした。

## 2. 結果

### 2-1. 卵径の周年変化

図 1 に年級群ごとの卵径の周年変化を示した。養成 2 年目の雌化ウナギの卵径は、5 月のサンプリングで他の 2 年級群と比べて有意に低値を示したが、その後各年級群間の有意差はみられなかった。11 月以降では養成 2 年目の卵径が他の 2 年級群より高値を示した。養成 3 年目と 6 年目を比較すると、ほとんどのサンプリングで養成 6 年目の卵径が低値を示した。

### 2-2. GSI の周年変化

図 2 に年級群ごとの GSI の周年変化を示した。養成 2 年目の雌化ウナギの GSI は、5 月のサンプリングで養成 6 年目より有意に低値を示したが、7 月以降のサンプリングでは養成 3 年目との間に有意差はみられず、11 月と 1 月のサンプリングでは、他の年級群に比べ高値を示した。養成 6 年目は、9 月以降、常に他の年級より低値を示し、10 月のサンプリングでは他の 2 年級群に比べ、有意に低値を示した。

### 2-3. 血中 11-KT の周年変化

図 3 に年級群ごとの血中 11-KT 量の周年変化を示した。5 月から 9 月までのサンプリングでは各年級群に有意差はみられなかったが、9 月から 10 月にかけて養成 6 年目の値が低下するのに対し、養成 2 年目と 3 年目は上昇し、特に養成 2 年目の値の上昇は顕著で、10 月には養成 6 年目と、11 月は他の 2 年級群と比べて有意に高値を示した。そして、1 月にかけて急激な値の低下がみられたものの、1 月の値は養成

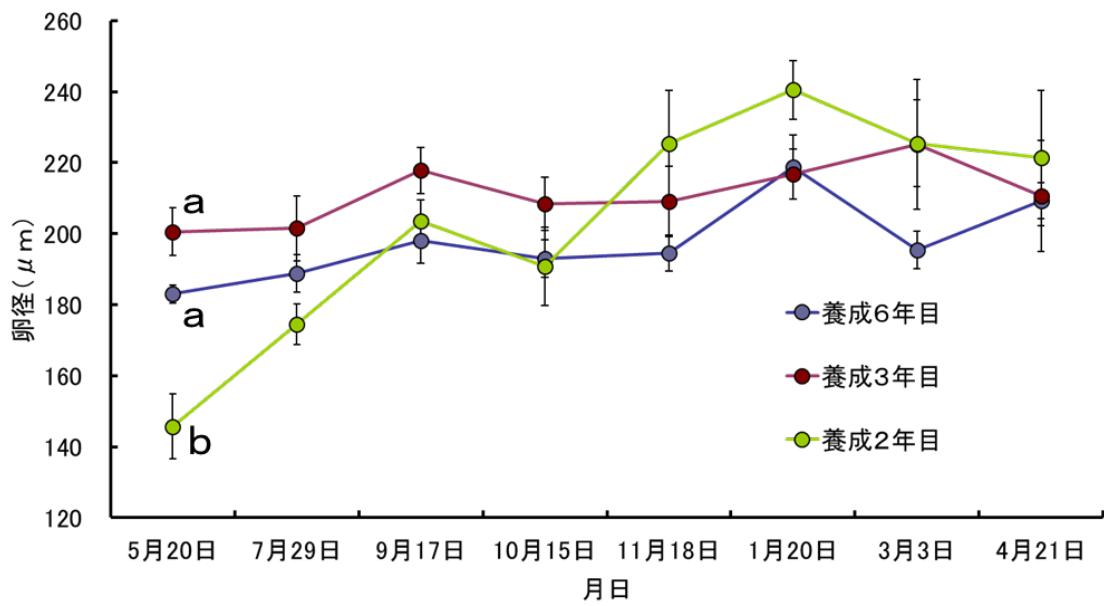


図1. 高水温条件下での各年級群の雌化ウナギにおける卵径の周年変化

異なるアルファベット間に有意差 ( $p < 0.05$ ) があること示し, バーは標準誤差を表す。

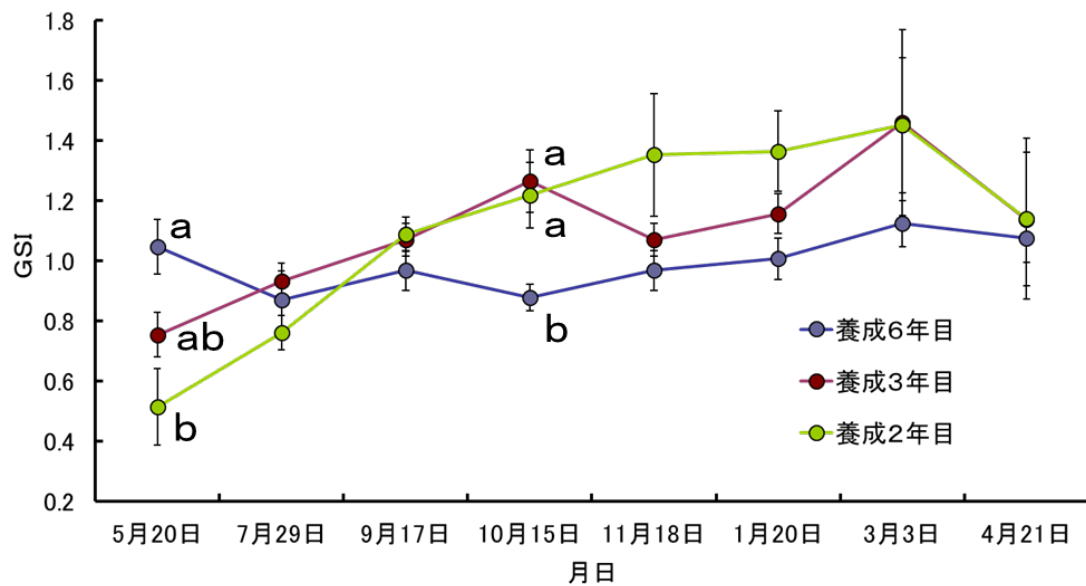


図2. 高水温条件下での各年級群の雌化ウナギにおけるGSIの周年変化

異なるアルファベット間に有意差 ( $p < 0.05$ ) があること示し、バーは標準誤差を表す。

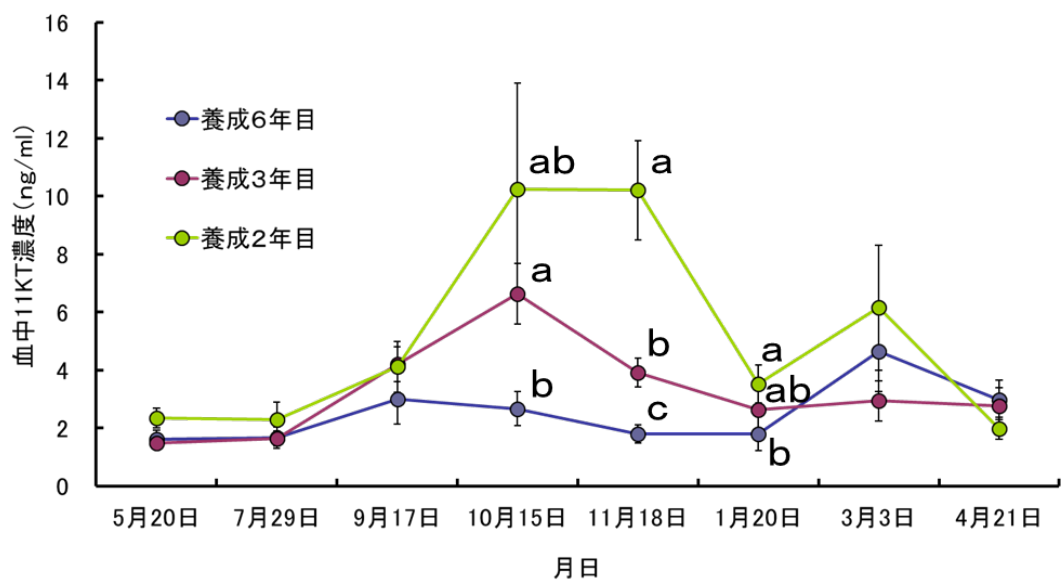


図3. 高水温条件下での各年級群の雌化ウナギにおける血中11KT濃度の周年変化

異なるアルファベット間に有意差 ( $p < 0.05$ ) があること示し、バーは標準誤差を表す

6年目に比べて有意に高値を示した。養成6年目の値は、9月から1月にかけて、他の年級群より低値を示した。

#### 2-4. 卵巣の組織学的観察

図 4-1,2,3 に年級群別の卵巣組織像を示した。卵巣中の卵母細胞のステージは個体により大きく異なり、油球形成前期から卵黄形成初期まで観られた。養成2年目では、5月には油球形成後期に達した卵母細胞は観察されなかったが、10月以降は油球形成後期の卵母細胞が多く、卵黄形成初期に達したものもあった。しかし、養成3年目の5月になると、油球形成後期の卵母細胞は一部の個体を除き退行した。10月以降は油球形成後期の卵母細胞は観られたが、2年目ほど発達した個体は多くはなかった。養成6年目になると、油球形成後期に達する卵母細胞はほとんど観られなかった。

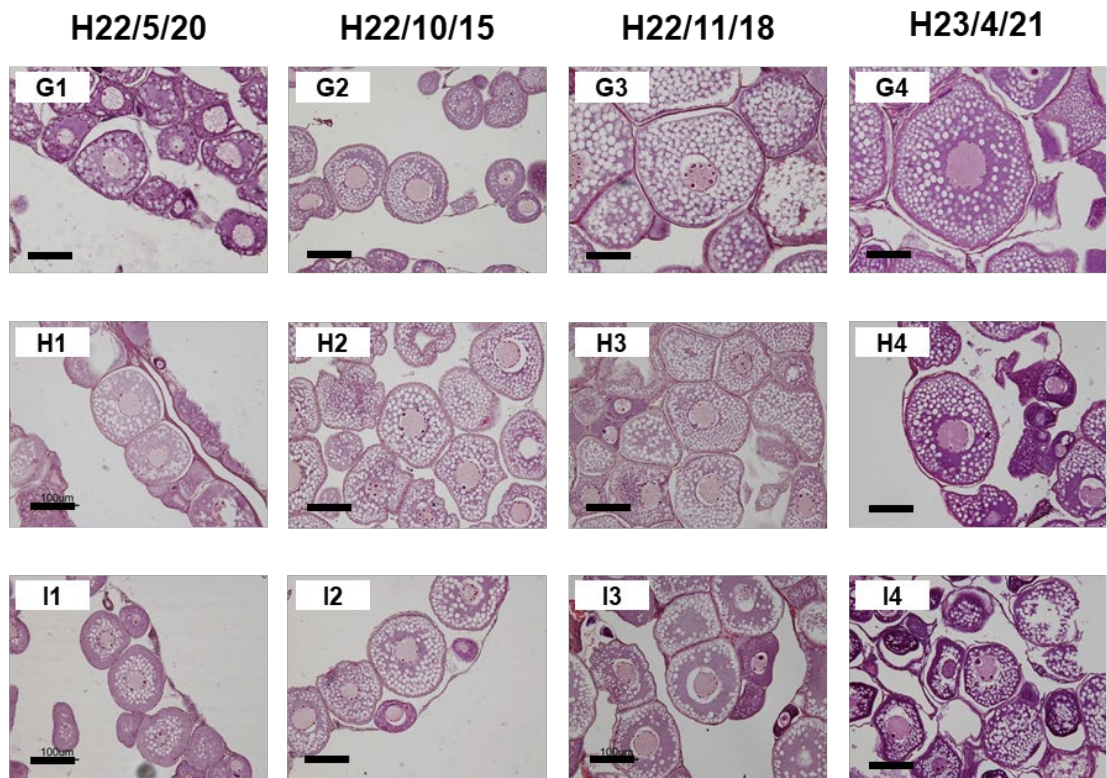


図4-1. 養成2年目の個体における卵母細胞の変化

養成2年目の3個体における平成22年5月20日—平成23年4月21日の卵母細胞のHE染色像を示す。上段から順に、卵母細胞の卵径が大きい個体 (G1-G4)、平均的な個体 (H1-H4)、小さい個体 (I1-I4) の組織像

Scale Bar: 100  $\mu$ m

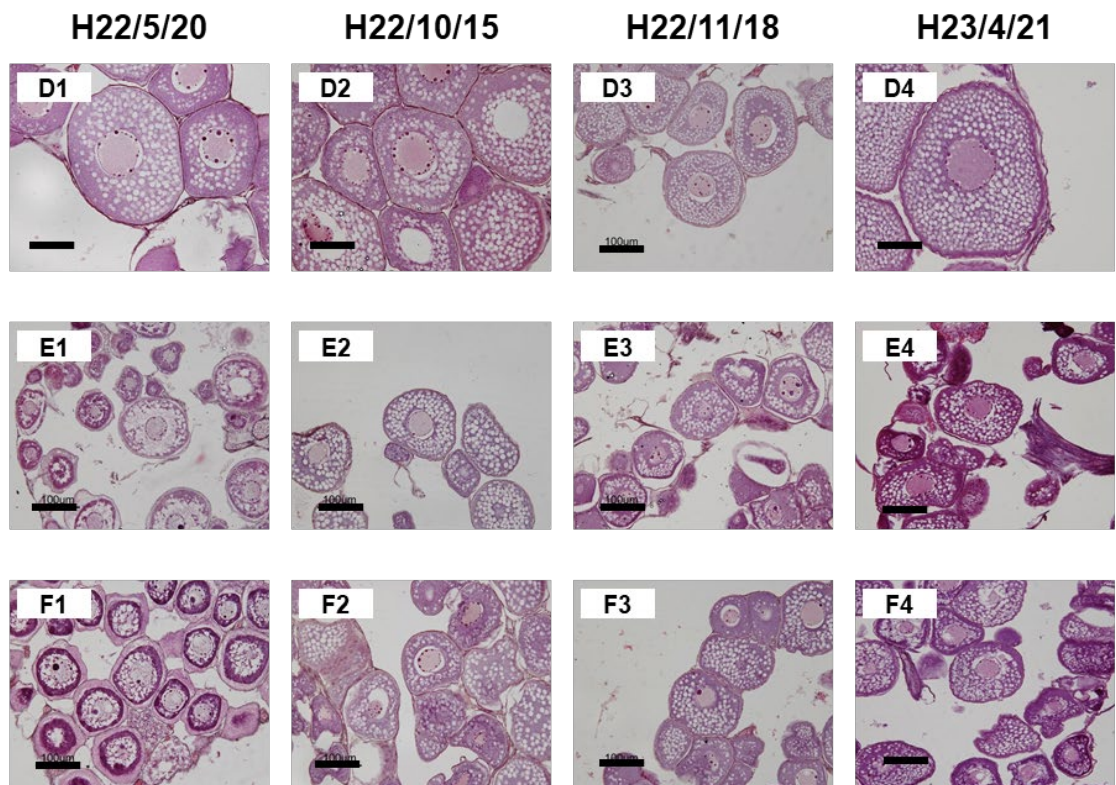


図4-2. 養成3年目の個体における卵母細胞の変化

養成3年目の3個体における平成22年5月20日—平成23年4月21日の卵母細胞のHE染色像を示す。上段から順に、卵母細胞の卵径が大きい個体 (D1-D4)、平均的な個体 (E1-E4)、小さい個体 (F1-F4) の組織像

Scale Bar: 100 µm



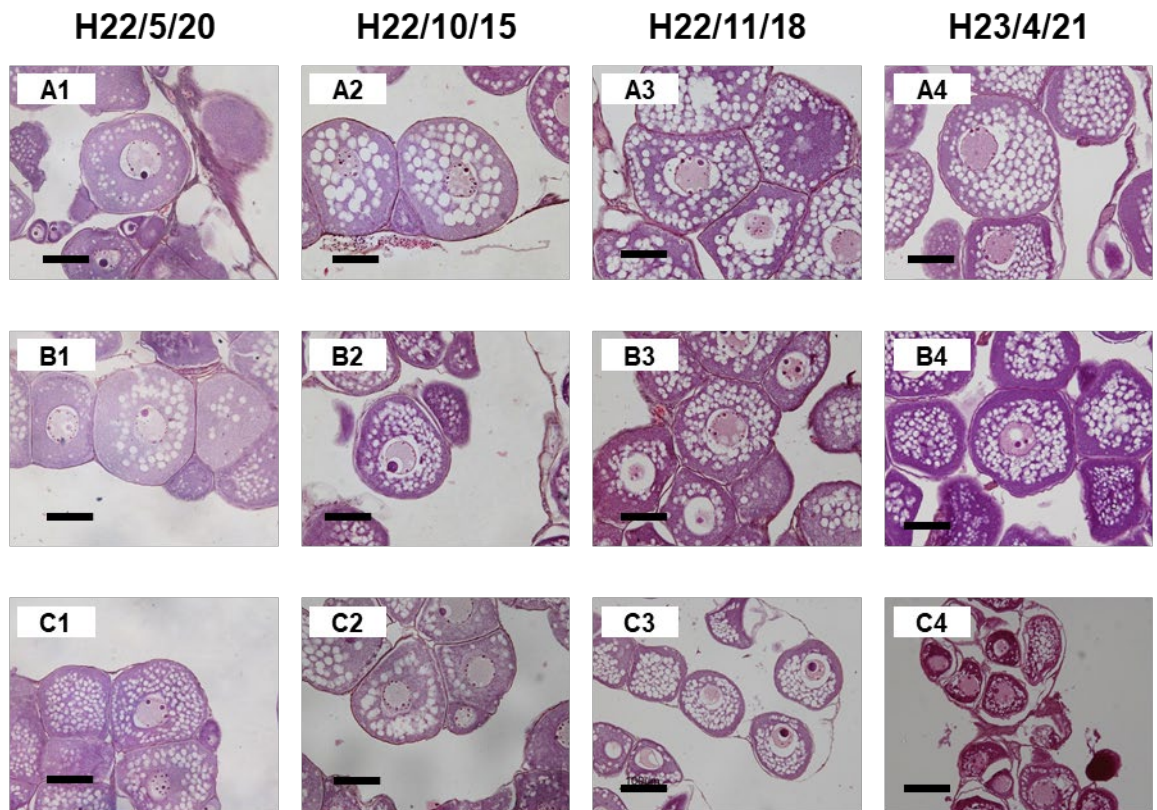


図4-3. 養成6年目の個体における卵母細胞の変化

養成6年目の3個体における平成22年5月20日—平成23年4月21日の卵母細胞のHE染色像を示す。上段から順に、卵母細胞の卵径が大きい個体 (A1-A4)、平均的な個体 (B1-B4)、小さい個体 (C1-C4) の組織像

Scale Bar: 100  $\mu$ m

### 3. 考察

本章では、年級群ごとの卵径、GSI、血中 11KT 量および卵巢中の卵母細胞の組織学的周年変化を調べた。その結果、養成 2 年目の雌化ウナギの卵径および GSI は、5 月には他の年級群と比べて有意に低値を示したが、11 月以降は、他の年級群に比べ高値を示した。卵巢中の卵母細胞のステージは 5 月には油球形成後期の卵母細胞は観られなかったが、10 月以降は油球形成後期の卵母細胞が多く、卵黄形成初期に達したものもあった。しかし、養成 3 年目の 5 月になると、油球形成後期の卵母細胞は多くが退行した。退行しなかった次群の卵母細胞は再び油球形成が進行したが、2 年目ほど発達したものは多くはなかった。養成 6 年目になると、卵径および GSI は、常に他の年級より低値を示し、油球形成後期に達する卵母細胞はほとんど観られなかった。これらの変化に伴い血中 11KT 量は養成 2 年目と 3 年目は春季から秋季に向けて上昇し、特に養成 2 年目の値の上昇は顕著で、他の年級群と比べて有意に高値を示した。一方、養成 6 年目の値は多くが他の年級群より低値を示した。

すなわち、初回成熟（春機発動）の養成 2 年目の個体は秋季に卵巢が発達し、卵母細胞の油球形成は顕著に進行するが、冬季から春季にかけて油球形成後期の卵母細胞の一部は退行すると思われる。養成 3 年目になると、卵巢中の退行していない次群の卵母細胞の油球形成は進行するが、2 回目の成熟では初回ほど発達した個体が少なくなると考えられる。このような周年変化を毎年繰り返すが、高齢になるほど油球形成後期に達する卵母細胞は少なくなる。ニホンウナギでは、油球形成は 11KT により促進されることがわかっており (Endo *et al.*,

2011), 血中 11KT 変化もこのことをよく裏付けていた。11KT 産生は主に生殖腺刺激ホルモン (GTH) の 1 つである濾胞刺激ホルモン (FSH) により支配されていると考えられることから, 初回成熟の秋季には FSH および 11KT により卵巣中の最も大きな卵母細胞が油球形成し, 冬至前後にはエストラジオール-17 $\beta$  (E2) の刺激により卵黄形成も開始すると思われる。その後日長が増加する春季に向けて FSH 産生が低下するのに伴い発達した卵母細胞は退行し, 春分の日以降に日長が徐々に増加すると再び FSH が産生され, 次群の卵母細胞の油球形成が進行するのであろう。

以上のように, 高齢になるほど秋季の卵巣発達が悪くなることが初めて明らかになり, このことが催熟結果に表れ, 良質卵が得にくくなると考えられる。また, 生検により個体を殺すことなく取り出した卵巣卵の卵径や血中 11KT 量が良質親魚を識別するよい指標となることも確認された。しかし, いずれの年級群においても卵巣発達の個体差は大きく, 若齢魚でも催熟成績が悪かったり, 高齢魚でも良質卵が得られたりすることも珍しくはないことから, 催熟前の卵巣発達度を事前に把握しておくことにより, 良質卵を多く得ることができるだろう。

### 第Ⅲ章 春季催熟技術の改善

秋季から冬季に行なう催熟結果に比べて、春季に行なう催熟成績は低い傾向がみられる。その原因の一つとして、第Ⅱ章で記したように、飼育下では秋季から冬季に発達した卵母細胞が、その後の継続飼育により退行するためと思われる。1年中、良質卵を得るためには、春季催熟結果の向上が不可欠であり、そのためには、卵母細胞の退行をなるべく防ぐ技術が必要不可欠である。そこで本章では、春季催熟前の冬季蓄養条件を検討し、卵母細胞の退行を防ぎ、春季催熟技術の改善を試みた。

## 1. 材料と方法

### 1-1. 供試魚

販売業者から 3～4 月に購入したシラスウナギに対し，エストラジオール-17 $\beta$ を市販のウナギ用飼料に混合（10 mg/kg 飼料）して 6 か月間給餌することにより雌化（Tachiki *et al.*, 1997）し，その後通常の市販飼料で年間飼育して，実験には養成 2 年目の雌化養成ウナギを用いた。

### 1-2. 冬季蓄養環境条件

秋季の飼育水温低下をせず，12 月 1 日までは水温 26～28℃，自然日長で淡水給餌飼育した。12 月 1 日から 4 月 11 日まで図 5 に示す条件で蓄養し，12 月海水化自然水温区，12 月海水化 15℃区，2 月海水化 15℃区，淡水高水温区（給餌あり）の計 4 群を設けた。3 月 28 日には全群水温 15℃で海水馴致した。

### 1-3. 催熟前の卵径の測定と卵巣の組織学的観察

4 月 5, 6 日のサンプリング時には，供試魚を 2-フェノキシエタノールで麻酔した後，体重を測定し（各年級群の全長と体重），バイオプシー法により採取した卵巣組織をウナギ用リンゲル（NaCl 151 mM, KCl 3.3 mM, CaCl<sub>2</sub> 4.9 mM, MgCl<sub>2</sub> 3.5 mM, HEPES 10 mM, pH 7.4）で満たしたシャーレの中に入れ，一部はピンセットで卵濾胞を分離し，実体顕微鏡下で撮影した。残りの卵巣片はブアン氏液で固定した。卵濾胞の写真から 100 個分の卵径（壊卵は除外）をランダムに測定し，上位 20 個分の平均値を最大卵群卵径として求めた。一方，固定した卵巣片は組織学的に観察した。

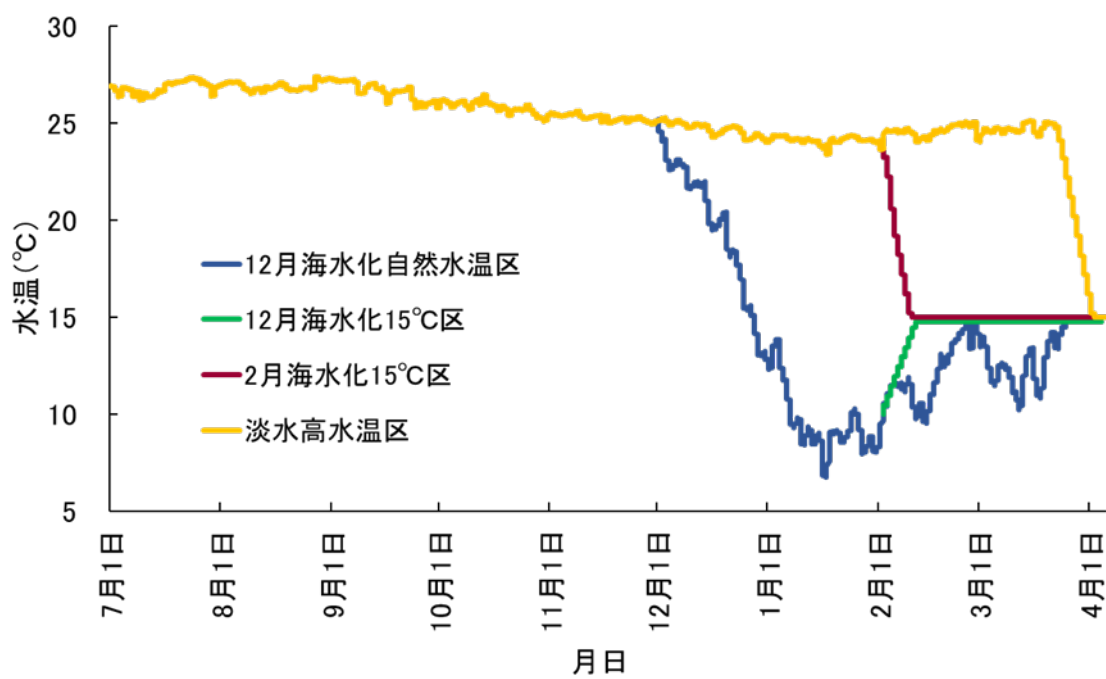


図5. 各試験区の飼育水温変化

卵巣片は、ブアン氏液で 2 日間固定した後、70%エタノールで保存した。その後、エタノールで脱水後、常法に従いパラフィン包埋し、5  $\mu\text{m}$  の組織切片を作製した。切片作製後、ヘマトキシリン-エオシン染色を行ない、光学顕微鏡により観察した。

#### 1-4. 催熟

蓄養終了後、4月11日から水温 15°C で Kagawa *et al.* (1997) および Ohta *et al.* (1997) が報告した方法にそれぞれ修正を加え、雌ウナギおよび雄ウナギに催熟を行なった。

各試験区 19~20 尾の雌を 4 つの 2000 L 水槽で飼育した。水槽には砂ろ過した 15 °C の海水を供給した（掛け流し方式）。雌ウナギには毎週月曜日に SPE (20 mg/kg-BW) を腹腔内投与し、15 週間実施し、それまでに採卵に至らない個体は、非成熟個体とした。毎週注射前に体重を測定し、催熟期間中に死亡した率や採卵までの経過週数について測定した。

雄ウナギには毎週月曜日にヒト絨毛性ゴナドトロピン (2000 IU/kg-BW) を腹腔内注射し、15 週間間実施した。排精した雄から精子を繰り返し得て、人工精漿 (Ohta and Izawa, 1996) で 100 倍に希釈し、3 週間以内に人工授精に使用した。使用前には顕微鏡を用いて、精子の運動活性を評価した。

ホルモン注射や配偶子採取の際には、雌雄のウナギは海水に溶かした 2-フェノキシエタノール (1 mL/L) で麻酔をかけた。

### 1-5. 孵化実験

卵 (2 g) にあらかじめ希釈した精液 (精子運動率 50%以上) 1 mL を授精し, 100 mL の海水に分散させた。約 120 個の卵を含むこの海水 3 mL を用いて, 48 ウェル組織培養マイクロプレートを用いた個別飼育法 (Unuma *et al.*, 2004) で孵化率を測定し, 受精卵を入れたマイクロプレートは 25°C で培養した。孵化率は人工授精から 3 日後に計数した。この値は, 各雌について以下の式で算出した。

$$\text{孵化率 (\%)} = 100 \times (\text{孵化仔魚の数}) / (\text{マイクロプレートに収容された受精卵の数})$$

### 1-6. 統計処理

データは特に指定がない限り, 平均値±標準誤差で表した。各指標の群間の差を調べるために, Fisher の正確確率検定 (拡張版) (<http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/exact/exact.html>) または, BellCurve for Excel version 2.0 (Social Survey Research Information Co., Ltd; Tokyo, Japan) を用いて, 一元配置分散分析の後, Tukey-Kramer 検定, または, Kruskal Wallis 検定の後, Steel-Dwass 検定を行なった。統計的有意性は  $p < 0.05$  とした。



## 2. 結果

### 2-1. 飼育水温変化

図 5 に、各試験区の冬季蓄養時の水温を示した。12 月海水化自然水温区は、12 月 1 日の海水注水後から水温は低下し、1 月 17 日に最低飼育水温 6.8℃となった。その後水温は上昇し、2 月 28 日までに 14.7℃まで上昇した後、3 月 13 日に 10.3℃まで再び低下し、その後 14.2℃まで上昇した。そして 3 月 28 日に、催熟試験のため海水 15℃で飼育した。

12 月海水化 15℃区は、前述の 12 月海水化自然水温区と同様に、1 月 17 日に最低飼育水温 6.8℃となり、2 月 1 日に飼育水温 10.0℃まで上昇した後、その日から、催熟試験のため海水 15℃で飼育した。

2 月海水化 15℃区は、最低飼育水温 24.0℃の淡水で飼育した後、2 月 1 日から催熟試験のため海水馴致を行いながら、飼育水温 15℃とした。

淡水高水温区は、最低飼育水温 23.7℃の淡水で飼育した後、催熟試験のため 3 月 28 日から海水馴致を行いながら、飼育水温 15℃とした。

### 2-2. 催熟前の卵径

図 6 に、各試験区の雌ウナギの催熟前卵径を示した。12 月海水化自然水温区は平均  $244.7 \pm 7.5 \mu\text{m}$ 、12 月海水化 15℃区は  $222.3 \pm 15.6 \mu\text{m}$ 、2 月海水化 15℃区は  $204.1 \pm 8.4 \mu\text{m}$ 、そして淡水高水温区は  $205.4 \pm 10.2 \mu\text{m}$  となった。Kruskal Wallis 検定の後、Steel-Dwass 検定を行なった結果、12 月海水化自然水温区と 2 月海水化 15℃区および淡水高水

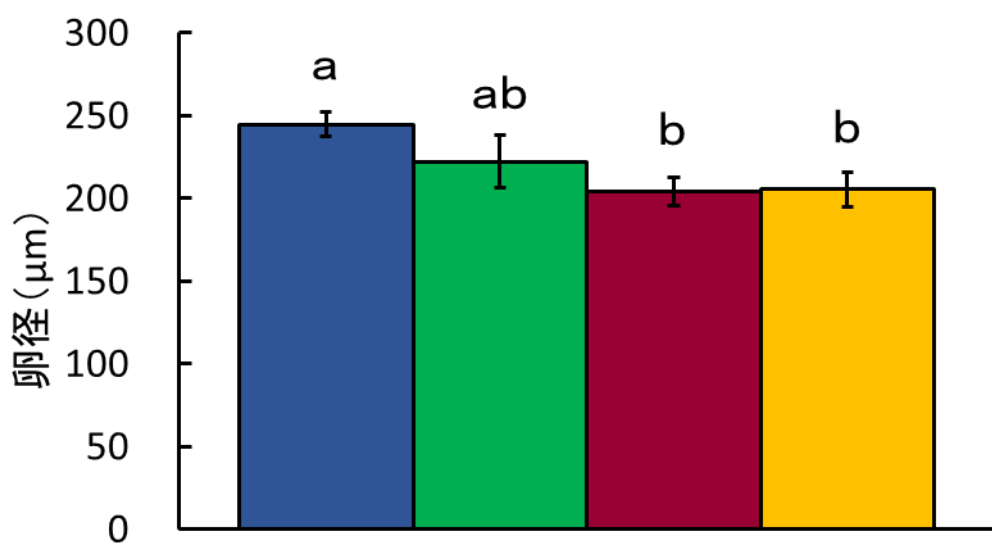


図6. 各試験区の雌ウナギの催熟前卵径

- 12月海水化自然水温区
- 12月海水化15°C区
- 2月海水化15°C区
- 淡水高水温区

異なるアルファベット間に有意差 ( $p < 0.05$ ) があること示し、バーは標準誤差を表す。

温区の間には有意差がみられ、12月海水化自然水温区が最も高値を示した。

### 2-3. 孵化率

図 7 に、各試験区のふ化率を示した。12月海水化自然水温区は平均  $23.2 \pm 6.4\%$ 、12月海水化  $15^\circ\text{C}$  区は平均  $56.9 \pm 7.8\%$ 、2月海水化  $15^\circ\text{C}$  区は平均  $39.6 \pm 7.5\%$ 、淡水高水温区は平均  $31.8 \pm 8.4\%$  となった。一元配置分散分析の後、Tukey-Kramer 検定を行なった結果、12月海水化自然水温区と12月海水化  $15^\circ\text{C}$  区の間には有意差がみられ、12月海水化自然水温区は有意に低値を示した。

### 2-4. 非成熟率

表 1 に、各試験区の非成熟率を示した。12月海水化自然水温区は全て採卵に至ったのに対し、他の試験区では  $15.0 \sim 21.1\%$  の非成熟個体が発生したが、Fisher の正確確率検定の結果、各試験区の非成熟率に有意差はみられなかった。

### 2-5. 死亡率

表 1 に、各試験区の死亡率を示した。12月海水化自然水温区のみ  $10.5\%$  の死亡個体が見られたが、Fisher の正確確率検定の結果、各試験区の死亡率に有意差はみられなかった。

### 2-6. 採卵までの経過週数

表 1 に、各試験区の採卵までの経過週数を示した。採卵に至るまで、

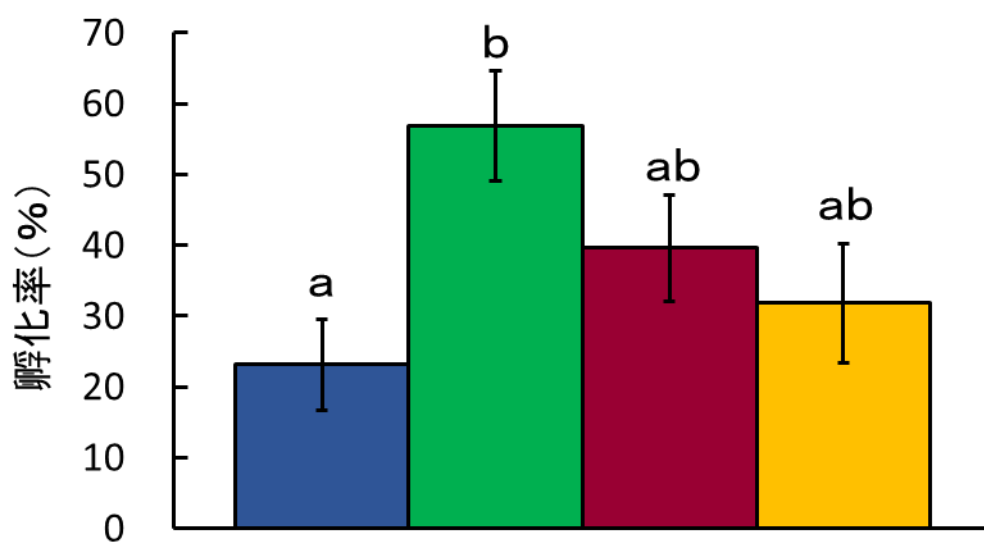


図7. 各試験区の孵化率

- 12月海水化自然水温区
- 12月海水化15°C区
- 2月海水化15°C区
- 淡水高水温区

異なるアルファベット間に有意差 ( $p < 0.05$ ) があること示し、バーは標準誤差を表す。

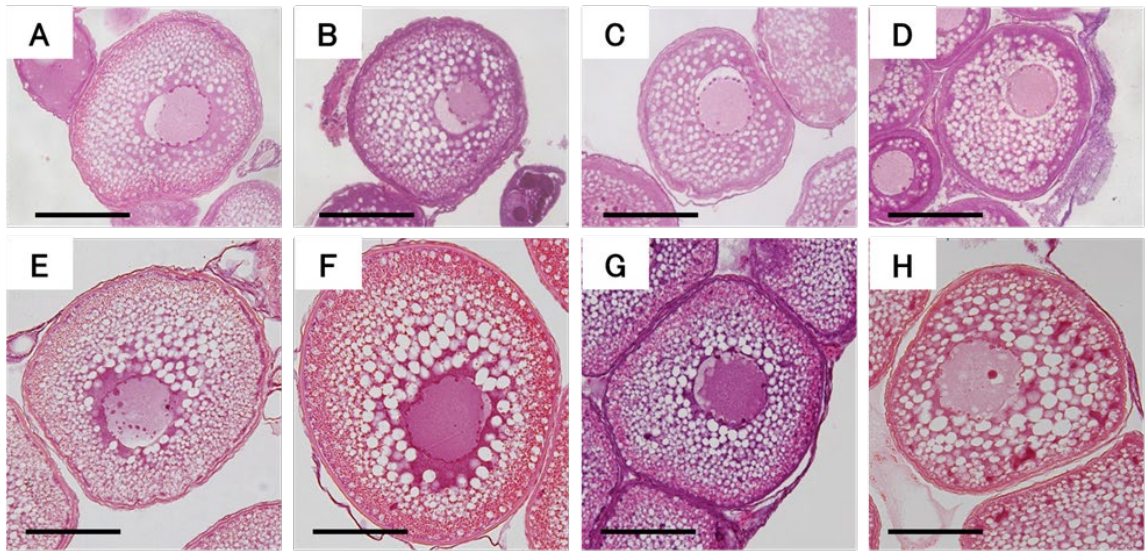
表1. 春季催熟に及ぼす冬季蓄養条件の影響

試験区	供試魚数	成熟			死亡			採卵までの経過週数	
		対象尾数	非成熟尾数	非成熟率(%)	対象尾数	死亡尾数	死亡率(%)	対象尾数	平均±標準偏差(週)
1 12月海水化 自然水温区	19	17	0	0	19	2	10.5	18	9.7±1.9
2 12月海水化 15℃区	20	20	3	15.0	20	0	0	17	9.2±2.2
3 2月海水化 15℃区	19	19	4	21.1	19	0	0	15	11.2±1.9
4 淡水高水温区	19	19	4	21.1	19	0	0	15	10.9±2.6

12月海水化自然水温区は平均  $9.7 \pm 1.9$  週，12月海水化  $15^{\circ}\text{C}$  区は平均  $9.2 \pm 2.2$  週，2月海水化  $15^{\circ}\text{C}$  区は平均  $11.2 \pm 1.9$  週，淡水高水温区は平均  $10.9 \pm 2.6$  週かかったが，一元配置分散分析の後，Tukey-Kramer 検定を行なったが，各試験区の採卵までの経過週数に有意差はみられなかった。

#### 2-7. 催熟前の卵巣の組織学的観察

図 8 に，各試験区の平均的な卵母細胞および最も発達した卵母細胞の組織像を示した。卵母細胞のステージは各群で油球形成後期から卵黄形成初期の卵母細胞を有する個体がみられたが，個体差が大きく，油球形成前期の卵母細胞しか持たない個体や卵黄形成中期に達した個体も観察された。



バーは100μmを示す

図8. 各試験区の雌ウナギ催熟前の卵母細胞

A,E: 12月海水化自然水温区 B,F: 12月海水化15°C区

C,G: 2月海水化15°C区 D,H: 淡水高水温区

A,B,C,D: 各試験区の平均的な卵母細胞

E,F,G,H: 各試験区で最も発達した卵母細胞.

### 3. 考察

本章では、春季催熟技術の改善を目的として、春季催熟前の冬季蓄養条件を検討した。Ⅱ章では冬季の水温が約 23℃にまで低下したため、秋季の性成熟が進行し、春季には卵母細胞の一部が退行を開始した。そこで本章においては、12月1日までは水温 26~28℃、自然日長で淡水給餌飼育した。12月1日からは12月海水化自然水温区、12月海水化 15℃区、2月海水化 15℃区、淡水高水温区（給餌あり）の計4群を設けた。3月28日には全群水温 15℃で海水馴致した。これらの条件で蓄養した結果、催熟前には全群で卵径 200 μm 以上あり、催熟可能なサイズと確認された。Ⅱ章の結果では、4月頃から卵母細胞の一部が退行するようであるが、淡水高水温区でも顕著な退行は観られなかったため、少なくとも養成2年目の秋から4月までは催熟に使用できると考えられる。本研究では、催熟前に 15℃に水温低下と海水馴致をしているため、淡水高水温区でも孵化仔魚が得られたと思われる。各群の催熟の結果、平均孵化率は約 20-60%と多くの良質卵が得られた。採卵までの経過週数から判断すると、12月海水化自然水温区と12月海水化 15℃区における催熟前の卵巣発達はやや進行していたようである。組織学的観察では、各群で油球形成後期から卵黄形成初期の卵母細胞を有する個体がみられたが、淡水高水温区では卵黄形成を開始している個体はいなかった。従って、卵黄形成は低水温（15℃）で2週間程度では開始しないと思われる。

以上のように、春季催熟前の冬期蓄養の水温低下と海水化が卵巣発達を促進することおよび高水温かつ淡水環境が卵巣発達を抑制することが確認された。12月海水化 15℃区の平均ふ化率は約 60%と極めて



良質卵が得られる個体が多かった。一方、12月海水化自然水温区は有意にふ化率が低かったが、催熟前の水温が15℃区より低かったことが原因かもしれない。また、催熟前の卵巣発達の個体差が大きいことも明らかになった。II章の結果から判断すると、高水温条件でも5月から夏ころまでは卵母細胞の退行がさらに進行すると思われ、この時期の催熟と採卵は難しくなると考えられるため、今後親魚の飼育環境（水温と日長）を工夫する必要がある。

## 第IV章 油球ステージ法の確立による催熟技術の高度化

### 第1節 ニホンウナギ卵母細胞における油球の融合：ステージ分類と卵母細胞の最終成熟および排卵誘発のためのバイオマーカーとしての利用

現在、ウナギの卵を得るためのプロトコールでは、雌に毎週 SPE を注射して卵母細胞の発達を促している。卵母細胞が十分に成長した成熟雌は、減数分裂の再開と卵核胞の崩壊を含む卵母細胞の最終成熟とそれに続く排卵を誘導するために、さらにプライミングのための SPE と卵成熟誘起ステロイド (MIS) またはその前駆体を投与される (Kagawa *et al.*, 2005)。これらの処理を行わないと、卵母細胞は最終成熟と排卵に至ることは殆どなく、多くの場合さらになる SPE の注射より細胞質が変性し、過熟となる (Kagawa *et al.*, 2005)。卵質が低い最も大きな原因は、これらのホルモン処理のタイミングが不適切であることが挙げられる。雌の成熟の進行を評価するために、最近のウナギの催熟プロトコールでは、比体重と卵母細胞径がマーカーとして使用されている。しかし、他のバイオマーカーを用いることで、排卵誘発する最適なタイミングを見つけやすくなり、結果として卵質が向上する可能性がある。その候補の一つが卵母細胞中の油球である。油球は最終成熟期に互いに融合することで急速な形態変化を示す (Sugimoto *et al.*, 1976 ; Pedersen, 2003 ; Palstra *et al.*, 2005)。油球をバイオマーカーとして利用するためには、その融合の進行度合いを段階的に分類することが必要である。本節では、ウナギ卵母細胞における油球の形態変化を分類し、SPE と MIS の連続処理による排卵誘

発のタイミングを最適化するためのバイオマーカーとしての有効性を検討した。

## 1. 材料と方法

### 1-1. 供試魚

販売業者から購入したシラスウナギに対し、エストラジオール-17 $\beta$ を市販のウナギ用飼料に混合（10 mg/kg 飼料）して6か月間給餌することにより雌化（Tachiki *et al.*, 1997）し、その後通常の市販飼料で1～4年間飼育して雌親魚とした。シラスウナギの一部は、エストラジオール-17 $\beta$ 処理を行わずに飼育し、雄親魚を得た。また、島根県宍道湖や千葉県利根川で捕獲した銀ウナギの雌も親魚として使用した。雌雄親魚は海水馴致した後に催熟に供し、その後は給餌を行わなかった。また、データは特に指定がない限り、平均値 $\pm$ 標準偏差で表した。

### 1-2. 催熟

催熟に関しては、雌は Kagawa *et al.* (1997)、雄は Ohta *et al.* (1997) に従って、修正を加えながら実施した。

実験1は、静岡県水産技術研究所浜名湖分場にて実施した。この研究所で飼育されていた28尾の雌（751 $\pm$ 308 g）を、2つの2000 L循環水槽に収容し、海水15 $^{\circ}$ Cで飼育した。毎週月曜日にSPE（20 mg/kg-BW）を腹腔内投与し飼育した。また、毎回注射前に体重を測定し、以下の式で比体重を算出した。

$$\text{比体重 (\%)} = \text{体重} \times 100 / \text{ホルモン処理開始時体重}$$

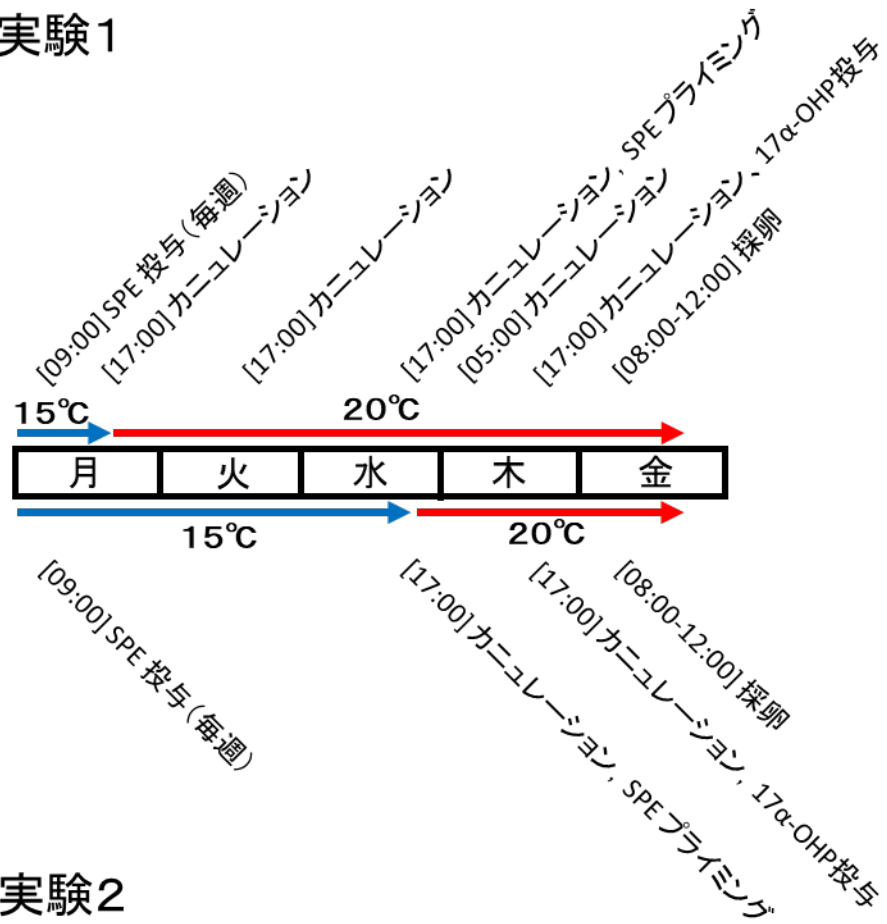
比体重が105%を超えた時点で、月曜日に水温20 $^{\circ}$ Cに設定した1000 L水槽に移し、図9-Aに示すように排卵まで毎日、カニューレーション

により生殖孔から卵母細胞を採取した。これらの魚に、水曜日にプライミングのために SPE (20 mg/kg-BW) を、木曜日に最終成熟と排卵を誘起するために DHP (17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン) の前駆体である 17 $\alpha$ -ヒドロキシprogesterone (17 $\alpha$ -OHP, 2mg/kg-BW) を腹腔内に注射した。17 $\alpha$ -OHP 注射 15~19 時間後に、排卵した雌から採卵し、直ちに人工授精に供した。

実験 2 は、水産総合研究センター養殖研究所 (三重県) で実施した。愛知県水産試験場内水面漁業研究所, (株) いらご研究所あるいは水産総合研究センター志布志庁舎で飼育した雌親魚 (628 $\pm$ 213 g) 計 418 尾, さらに, 天然銀化ウナギ 48 尾 (653 $\pm$ 139 g) を 2007 年から 2009 年にかけて, その都度催熟した。10~15 尾の雌を 500L 流水式水槽, 海水 15 $^{\circ}$ C で飼育し, 実験 1 と同様に SPE を投与した。比体重が 105% を超えた後, 図 9-B に示すように, カニキュレーションにより生殖孔から卵母細胞を採取した。卵母細胞の直径が 800  $\mu$ m を超えた場合は, 供試魚を水曜日に SPE でプライミングし, 水温 20 $^{\circ}$ C に設定した 1000 L 水槽に移した。卵母細胞の最終成熟と排卵の誘導および採卵は, 実験 1 と同様に行なった。

実験 1, 2 とともに, 雄ウナギに関してはヒト絨毛性ゴナドトロピン (2000 IU/kg-BW) を毎週月曜日に腹腔内投与し, 催熟した。排精した雄ウナギの腹部を軽く圧迫することにより生殖孔から繰り返し採取した精液を人工精漿 (Ohta and Izawa, 1996) で 100 倍に希釈し, 3 週間以内に人工授精に使用した。使用に際しては, 精子の運動活性を顕微鏡で評価した。

## A 実験1



## B 実験2

図9. 実験スケジュール

### 1-3. 孵化実験

採卵した中から 2 g の卵を計り取り，人工精漿で希釈した精液 1 mL (精子運動率 50%以上) を媒精した後，100 mL 中約 30 mL の海水を入れて人工授精を行い，約 1 分経過した後，100 mL のビーカーに戻した。駒込ピペットで海水をポンピングし，よく攪拌した後，任意に受精卵ごと海水 1 mL を 3 回計り取り，シャーレに入れた。これに含まれる約 120 個の卵を用いて，実験 1 ではシャーレを用いた従来法 (Unuma *et al.*, 2005)，実験 2 では 48 ウェル浮遊培養用マイクロプレートを用いた個別飼育法 (Unuma *et al.*, 2004) で，孵化率を評価した。受精卵を入れたシャーレやマイクロプレートは 25°C のインキュベーター中で飼育した。孵化率は，人工授精から 3 日後に測定した。孵化率は，各雌について以下の式で算出した。

孵化率 (%) = 孵化仔魚の数 × 100 / シャーレまたはマイクロプレートに収容された卵の数

### 1-4. 卵母細胞と油球径の測定

カニューレーションにより採取した卵母細胞，または排卵後に採卵した卵を 0.9% NaCl 中にて，対物マイクロメーター付きの実体顕微鏡で写真撮影した。写真の中から，最も発達した形態のものをランダムに 10 個選び，卵母細胞とその中の油球の直径を測定した。各卵母細胞について，画像計測ソフトを用いて長径と短径を測定し，平均した値を卵母細胞の直径とした。また，各卵母細胞中の油球について，最も大きなものから 10 個について，直径を画像計測ソフトで測定した。

各油球の形状は、卵母細胞とは異なり、ほとんどが球状であるため、1回のみの測定とした。

#### 1-5. ステージ分類

各雌の成熟の進行を評価するために、カニキュレーションによって得られた卵母細胞群の中から、最も成熟していると考えられるものを任意に10個選び、それぞれについて、その形態を油球径によって10段階（ステージ）に分類した卵母細胞と比較することによって、油球ステージを決定した。なお、10個の卵母細胞全ての油球ステージを決定した後、中央値をその個体のステージとした。



## 2. 結果

### 2-1. 油球融合状態によるステージ分類

実験 1 で使用した 28 尾の雌親魚のうち、23 尾が排卵した。まず、実験 1 の 14 尾の雌について、火曜日から金曜日までに得られた卵母細胞 54 個と排卵後の卵 36 個の油球径を測定した。月曜日に得られた卵母細胞では、油球の融合が進行していないため各油球が認識できず、油球径を測定することができなかった。各卵母細胞中の最も大きな油球 10 個を測定し、最大 5 個の平均値を算出した。図 10 に卵母細胞の直径と油球の直径の関係を示した。卵母細胞の直径が 800 から 1100  $\mu\text{m}$  に増加するにつれて、油球の融合が進み、その直径は 30 から 180  $\mu\text{m}$  に増加した。そのため、1 つの卵母細胞に含まれる油球の数は減少した。

次に、油球の融合による形態変化を 10 のステージに分類し、ステージ 1, 2, 9, 10 以外では、5 つの最も大きな油球の平均直径に基づいて決定した。直径が 830  $\mu\text{m}$  未満の卵母細胞では、油球が認識出来ないため、油球直径を測定することができないものがほとんどであった。このような卵母細胞は、透明帯の幅によって 2 ステージ（ステージ 1, 2）に分類した。油球融合最終段階においては、一部の油球が大きくなる一方、残りの油球は小さいため、最大 5 つの油球の平均直径は減少した。このような卵母細胞のステージは、最大油球の直径のみに基づいて 2 つのステージ（ステージ 9 と 10）に分類した。油球の形態変化によるステージ分類の基準を表 2 に示す。これらの基準に基づき、油球の直径または透明帯の幅を測定した卵母細胞を 10 段階に分類し、標準卵母細胞とした。図 11 に、ステージ別の卵母細胞の代表的な形態

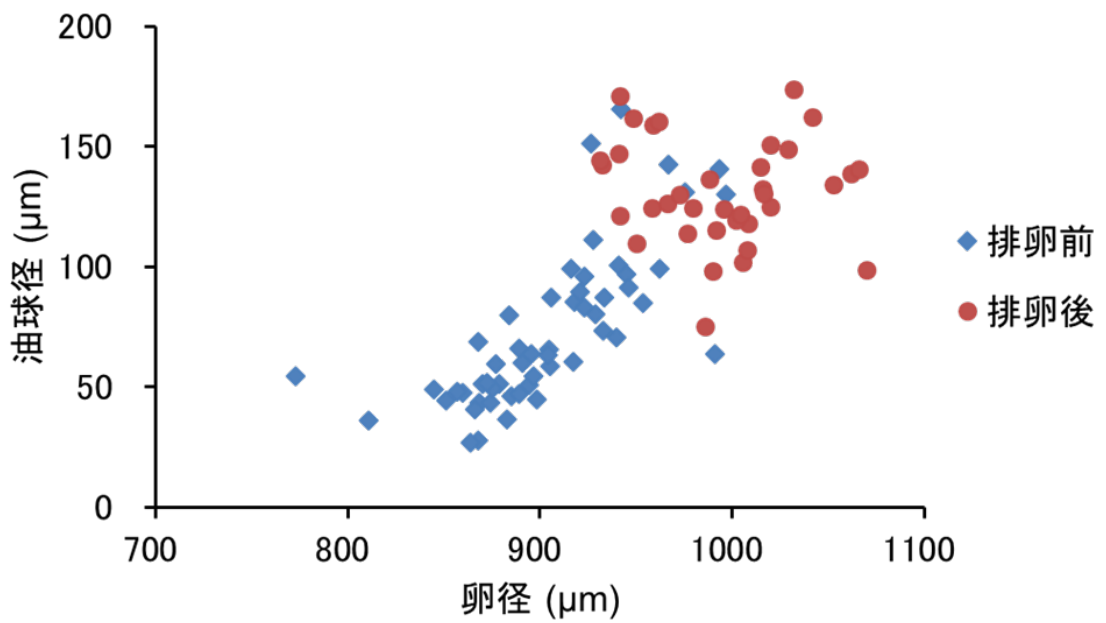


図10. 卵母細胞の直径と油球の直径の関係

表2. 油球の形態変化によるステージ分類の基準

ステージ	基準
1	油球径は測定不能。透明帯が卵径の1/4未満
2	油球径は測定不能。透明帯が卵径の1/4以上
3	油球径の上位5径平均値が $40-55 \mu\text{m}$
4	油球径の上位5径平均値が $55-70 \mu\text{m}$
5	油球径の上位5径平均値が $70-90 \mu\text{m}$
6	油球径の上位5径平均値が $90-110 \mu\text{m}$
7	油球径の上位5径平均値が $110-130 \mu\text{m}$
8	油球径の上位5径平均値が $130-150 \mu\text{m}$
9	最大油球の油球径が $200-250 \mu\text{m}$
10	最大油球の油球径が $250 \mu\text{m}$ 以上

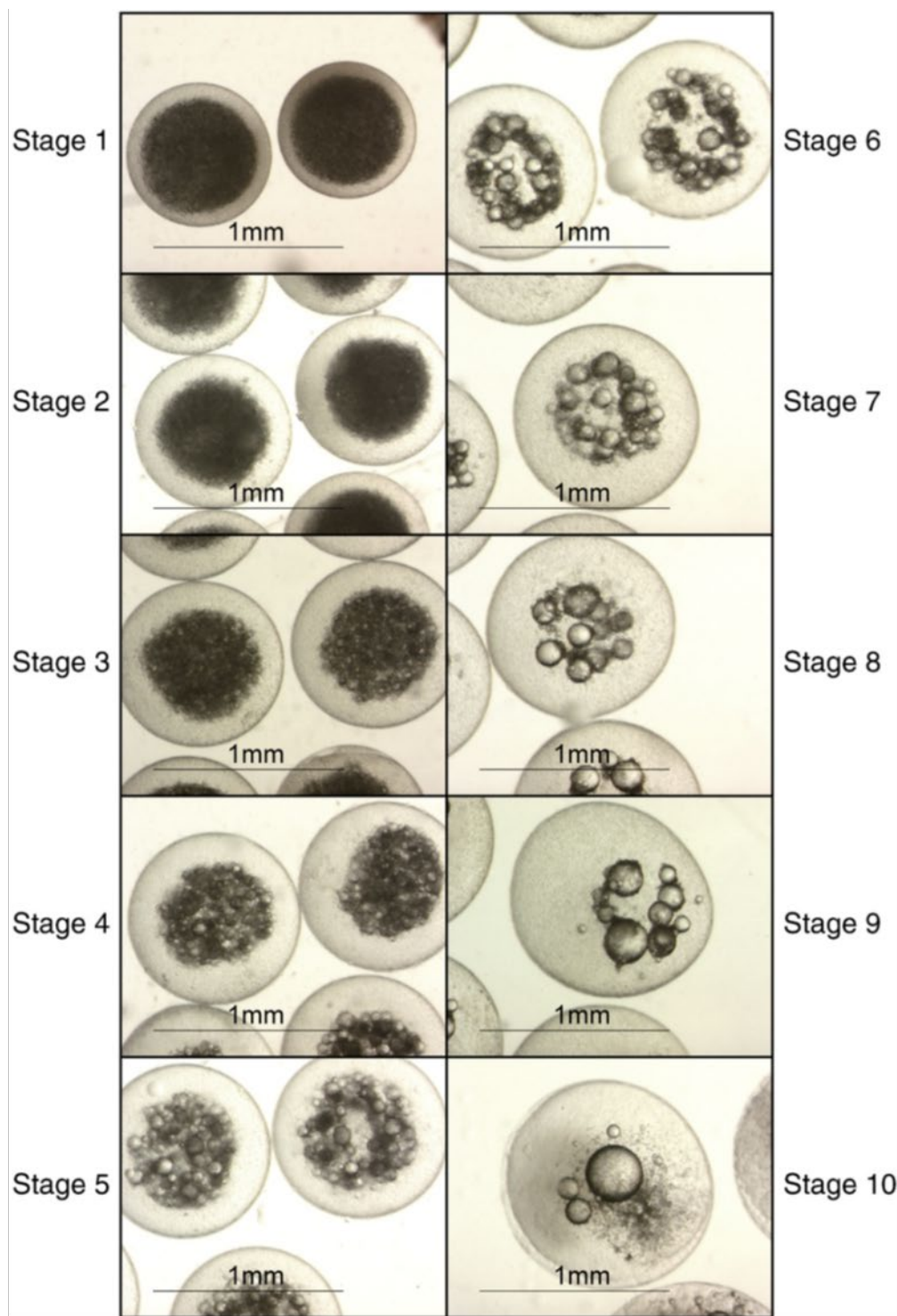


図11. ステージ別の卵母細胞の代表的な形態

を示す。次の 2-2 以降では、油球径をその都度測定することなく、これらの標準卵母細胞と採取した卵母細胞や排卵した卵の形態をその場で直接比較して判断することで、様々な卵母細胞の油球ステージを分類した。

実験 1 で 17 尾の雌から月曜日から金曜日までに得られた卵母細胞 81 個と排卵後の卵 36 個を、油球の直径または透明帯の幅に基づいて 10 段階に分類し、卵母細胞との関係を調べた (図 12)。全体として、異なる油球ステージにおける卵母細胞径は重なりあっていた。排卵前の卵母細胞径は、油球ステージ 1~7 に進むにつれて徐々に大きくなったが、ステージ 8 以降では明らかな増加を示さなかった。このことは、卵母細胞の成長と吸水がステージ 8 までに完了し、それ以降のステージの卵母細胞は過熟であることを示唆している。排卵後の卵径は、ステージ 5 から 10 まで、明らかな増加は見られなかった。

## 2-2. 油球ステージと卵質の関係 (実験 1)

実験 1 で排卵された 23 尾の雌の孵化率は 0~89.8% まで顕著に変動し、平均値は  $14.7 \pm 27.7\%$  であった。ホルモン処理による排卵誘導に最適なステージを推定するため、水曜日 (SPE プライミング)、木曜日 (17 $\alpha$ -OHP 投与)、金曜日 (排卵) の各日に雌 23 尾の油球ステージを決定し、排卵後の孵化率との関係を調べた (図 13)。水曜日のステージは 1~8 の間であった (図 13-A)。良質の卵 (孵化率 40% 以上) が得られた雌はステージ 4 付近に収束しており、このステージが SPE プライミングに最適であることが示唆された。木曜日には、ステージは 2~9 に

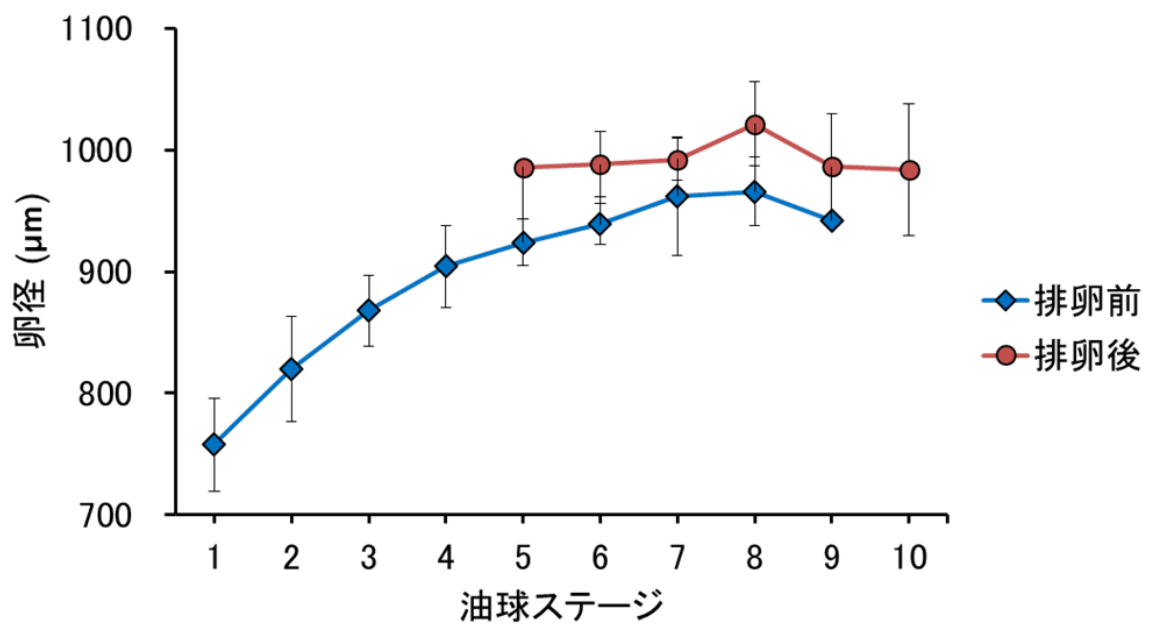


図12. 油球ステージと卵径の関係

なった (図 13-B)。良質の卵が得られた雌はステージ 6 付近に収束しており, このステージは  $17\alpha$ -OHP 投与に最適であることが示唆された。金曜日には, 排卵した卵のステージは 4 から 9.5 になっていた (図 13-C)。また, 良質の卵が得られた雌はステージ 7 付近に収束しており, このステージが排卵, 即ち人工授精に最適であることが示唆された。しかし, SPE プライミング,  $17\alpha$ -OHP 投与, 最良の人工授精のタイミングと推定されるステージで処理・排卵した雌の中にも, 孵化しない卵を持つ個体もあった。

### 2-3. 極上卵獲得時の油球ステージ (実験 2)

次に, 実験 1 で示唆された最適な排卵誘導ステージを確かなものとするために, 実験 2 において良質な卵が得られた多数の雌のケースについて分析した。なお, 実験 2 では, 養成ウナギ (平均孵化率  $21.1\pm 24.9\%$ ) よりも銀化ウナギ (平均孵化率  $44.5\pm 33.3\%$ ) で全体的に卵質が良好だった。排卵した雌約 400 匹のうち, 極上卵 (孵化率 80% 以上) が得られた雌は 13 匹 (養成ウナギ 6 尾, 銀化ウナギ 7 尾) であった。この 13 尾の雌親魚について, 水曜日 (SPE プライミング), 木曜日 ( $17\alpha$ -OHP 投与), 金曜日 (排卵) にそれぞれ油球ステージを決定し, その分布をヒストグラムで示した (図 14A~C)。銀化ウナギは養成ウナギよりもステージが速く推移する傾向があった。水曜日の油球ステージは 3~5 で, ステージ 4 がピークであった (図 14A)。しかし, 養成ウナギではステージ 4 よりもステージ 3 の個体数が多かった。木曜日では油球ステージは 5~7 であり, ステージ 6 がピークとなった (図 14B)。さらに, 金曜日にはステージ 6~8 になり, ステージ 7 がピ

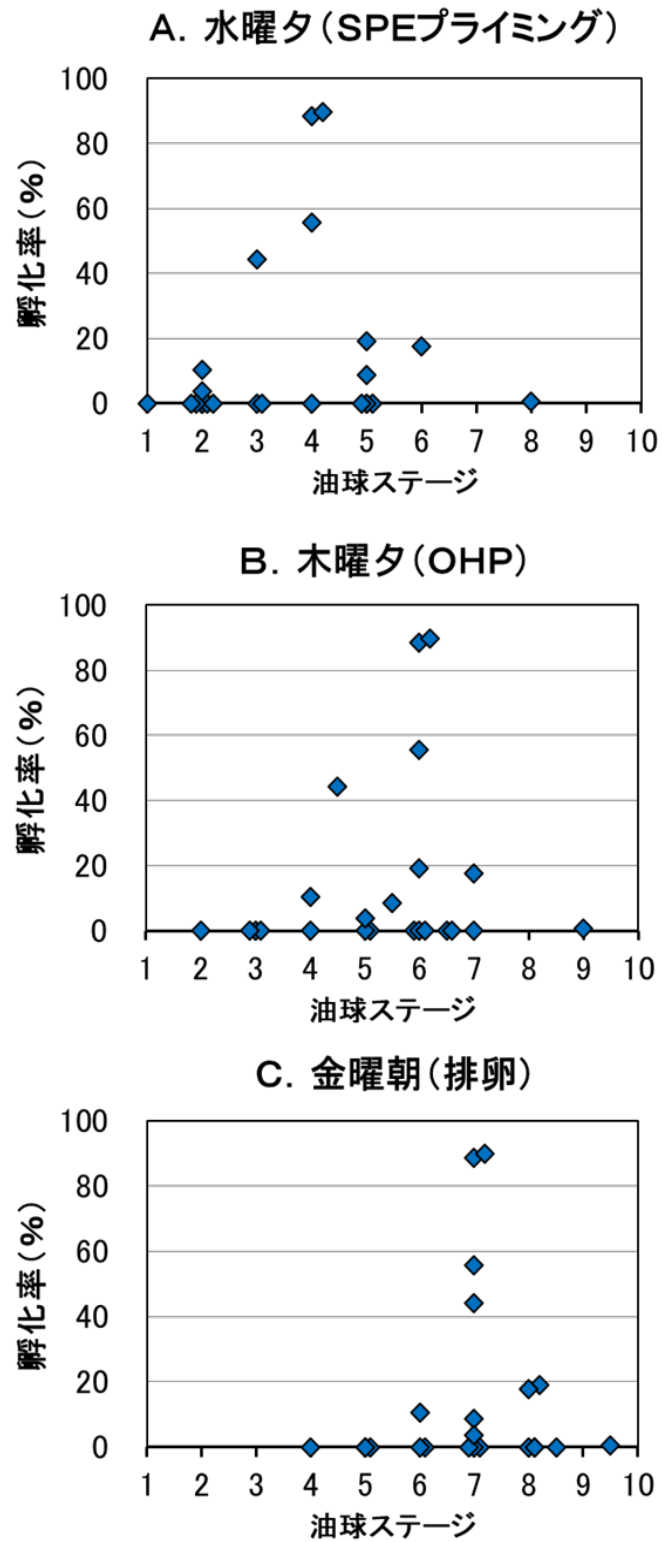


図13. プライミング, OHP投与時, 排卵時の油球ステージと孵化率の関係



ークとなった (図 14C)。

次に、ホルモン処理による排卵誘導時期を決定するバイオマーカーとしての油球ステージの有効性を、卵母細胞径 (図 14D~F) および比体重 (図 14G~I) と比較検討した。比較を容易にするため、水曜日から金曜日までに観測された卵母細胞径と比体重のデータを、油球ステージと同様に 6 つのクラスに分類した。油球ステージの場合と同様に、卵母細胞径、比体重ともに、銀化ウナギは養成ウナギよりも高い値で分類される傾向が確認された。卵母細胞径は、水曜日で 840~880  $\mu\text{m}$  をピークに 800~960  $\mu\text{m}$ 、木曜日で 880~920  $\mu\text{m}$  をピークに 880~1,000  $\mu\text{m}$  であり (図 14D~E)、SPE プライミングおよび  $17\alpha\text{-OHP}$  投与に適した卵母細胞径はそれぞれ約 840~880  $\mu\text{m}$  および 880~920  $\mu\text{m}$  と推察された。金曜日には、卵径は 920~1,040  $\mu\text{m}$  に増加し、明確なピークを示さなくなった (図 14F)。比体重は、水曜日には 120~140% をピークに 110~150% で、木曜日には 120~140% をピークに 120~170% (図 14G~H) に、金曜日には 130~140% でピーク (図 14I) となり、SPE プライミングと  $17\alpha\text{-OHP}$  投与に最適な比体重はそれぞれ 120~140% と 130~140% であると示唆された。金曜日の比体重は木曜日よりも低い値を示したが、これは排卵された卵の一部が採卵前に放出されたためである。全体として、卵母細胞径、比体重ともに、油球ステージのように 1 クラスに分布が集中することはなかった。

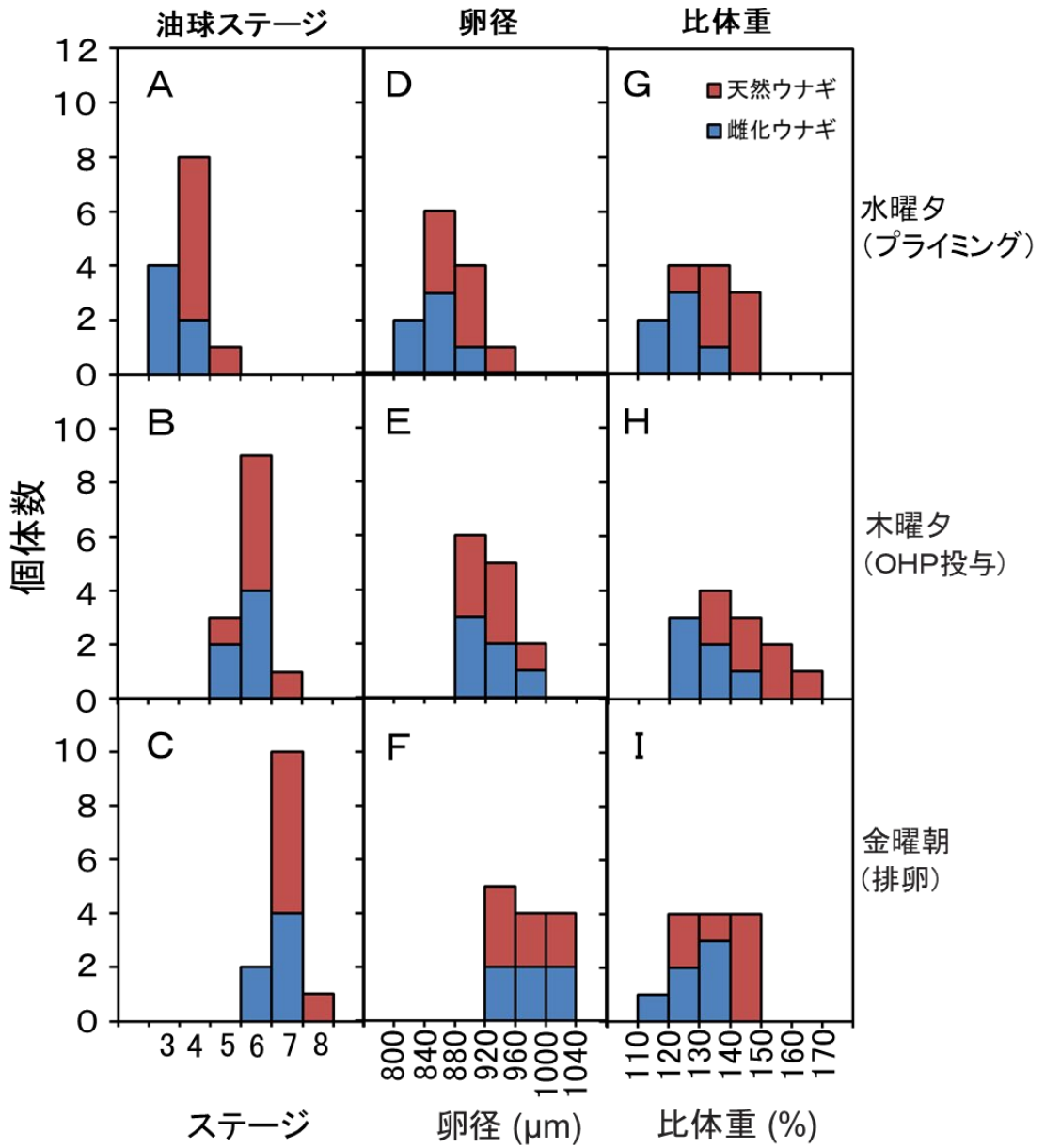


図14. プライミング, OHP投与時, 排卵時の油球ステージ, 卵径, 比体重

### 3. 考察

本研究では、ウナギ卵母細胞の油球の形態変化を直径により 10 段階に分類し (表 2, 図 11~12), ホルモン処理のタイミングと卵質の関係を調べることにより, 排卵誘導に最適な段階を明らかにした (図 13~14)。これまで, ウナギの卵母細胞の発達におけるステージ分類は, いくつかの論文で報告されている。ニホンウナギ, ニュージーランドウナギ (*Anguilla dieffenbachii*), ヨーロッパウナギ (*Anguilla anguilla*) の組織学的観察に基づいて, 染色仁期から核移動期, 過熟期までの幅広い卵母細胞の発達段階が分類された (Yamamoto *et al.*, 1974; Lokman and Young, 1998; Müller *et al.*, 2003)。卵母細胞の最終成熟については, Pedersen (2003) と Palstra *et al.* (2005) がヨーロッパウナギについて, 油球の出現, 卵母細胞径および核移動に基づいて, それぞれ 4 段階と 7 段階に分類している。しかし, これまでの研究では, 排卵誘導ホルモンを投与した段階とその後の排卵および卵質との関係は十分に解明されておらず, その主な理由は, 良質の卵を得た雌の事例数が不十分であったためである。

ウナギの卵質は, 他魚類で報告されているように, 様々な要因に依存している (Kjørsvik *et al.*, 1990; Brooks *et al.*, 1997)。例えば, 養成中の親魚の栄養状態は, 卵中のビタミンや脂肪酸などの生化学的組成に影響を与え, 孵化率や仔魚の生残率に影響を与える (Furuita *et al.*, 2003, 2006, 2007, 2009)。催熟前の雌親魚の種類 (天然, 雌化養成等) と飼育環境条件は, SPE の反復注射に対する応答性, ひいては卵質に影響を与える (Ijiri *et al.*, 1998 ; Chai *et al.*, 2010)。さらに, ウナギの卵は排卵後急速に過熟になるため, 排卵から人工授精までの時

間が受精率や孵化率に強く影響する (Ohta *et al.*, 1996)。したがって、卵質は最終的な卵母細胞の成熟と排卵を誘発するタイミングに完全に依存するわけではないが、卵質にとって重要な要因の一つであることは確かである。図 13 に示すように、推定される最適な時期に排卵させた雌でも低い質の卵が観察されることがあり、排卵誘発のタイミングは必要条件ではあるが、良質な卵を得るためには、さらなる要因の検討が重要であることを示唆している。ホルモン処理のタイミングだけを最適化しても、質の良い卵を安定的に生産することにはつながらないが、雌の成熟の進行を正確に把握し、最適なタイミングで排卵誘導を行なうことができれば、ホルモン処理の不適切なタイミングによる卵質低下を最小限に抑えることができる。

現在の雌ウナギの催熟の方法を用いると、極めて質の高い卵（孵化率 80%以上）は、まれにしか得られない。卵質は上記のように排卵誘発のタイミングだけに依存するわけではないが、ホルモン処理のタイミングを含め、卵質に必要な条件をすべて満たした場合にのみ、このような質の高い卵が得られると考えられる。したがって、そのような高い質の卵が得られた雌に SPE や MIS を投与したタイミングを調べることで、最適な処理のタイミングを明らかにすることができる。

本研究では、このような分析（実験 2）により、高い卵質の卵が得られた雌の多くは、ステージ 3（養成ウナギ）またはステージ 4（銀化ウナギ）で SPE をプライミングし、ステージ 6 で 17 $\alpha$ -OHP を投与し、その結果ステージ 7 で排卵したことがわかった（図 13A~C）。これらの結果と実験 1 の結果を合わせて考えると、高い質の卵を得るためには、SPE のプライミング、MIS 投与、排卵の最適なステージは、それ

ぞれステージ 3~4, 6, 7 であることが示唆された。図 14A~F に示すように、これらの雌の油球ステージは、水曜日から金曜日にかけて 1 つのステージに収束して進行し、そのピークは卵母細胞径（卵径）や比体重（図 14G~I）と比較して、明瞭に異なるように見える。このことは、成熟の進行を正確に評価するためには、卵母細胞径や比体重よりも油球ステージの方がより感度の高いバイオマーカーとなり得ることを意味する。このように、油球ステージと卵母細胞径をバイオマーカーとして併用することで、ニホンウナギにおいて質の高い卵の生産性が向上することが示唆された。

ウナギの雌の成熟の進行は、飼育水温に影響され (Sato *et al.*, 2006) た。また、*in vitro* の実験でも卵母細胞の最終成熟と排卵は、温度に影響されることが示されている (Kagawa, 2006)。したがって、油球ステージは飼育水温の影響を受けて進行することが予想される。本研究では、実験 1, 2 とともに SPE によるプライミングから排卵まで飼育水を 20℃に保ったため、温度管理が異なると排卵誘発の最適なステージが変化する可能性がある。MIS 投与（ステージ 6）と排卵（ステージ 7）の最適なステージは、異なる温度下でも一定であるはずである。一方、SPE によるプライミングは、MIS 投与の 24 時間前に行なう必要はない（鶴沼未発表データ）。プライミングから MIS 投与までの温度や時間が変われば、プライミングの最適な時期も変わるはずである。

以上のことから、油球の融合による形態変化は、雌ウナギのホルモン処理による最終成熟・排卵誘導の最適なタイミングを示すバイオマーカーとして利用することが可能である。SPE によるプライミングから排卵まで水温を 20℃に保ち、本研究のように SPE のプライミング

と MIS の投与間隔が 24 時間程度であれば、プライミングはステージ 3~4, MIS 投与はステージ 6, 排卵（人工授精）はステージ 7 が最適タイミングとなる。これらのステージで全ての雌を処理できるように技術を向上させれば、不適切な処理タイミングによる卵質低下を最小限に抑え、質の高い卵を得る機会を増やすことができると考えられる。

## 第 2 節 飼育水温の調節がニホンウナギの卵母細胞の成熟の進行に及ぼす影響

MIS 投与のタイミングは、卵の質に強く影響することが知られている。本研究では、第 IV 章第 1 節のとおり、ニホンウナギ卵母細胞の油球の融合を 10 段階に分類し、卵母細胞の最終成熟と排卵を誘導するバイオマーカーとして利用することを検討し、ステージ 6（最大 5 つの油球の平均直径；90-110  $\mu\text{m}$ ）が MIS 投与に最適であることを明らかにした。全ての雌にステージ 6 で MIS を注射すれば、不適切なタイミングでの MIS 投与による卵質低下を低減できる可能性がある。しかし、卵母細胞の成熟の進み具合には個体差があるため、各雌がいつ最適なステージに達するかを予測することはできない。したがって、すべての雌に最適なタイミングで MIS を投与するためには、催熟期間中、毎日 24 時間雌をモニターする必要がある。しかし、このような方法で種苗生産試験中に毎日実施することは非現実的であり、現在のプロトコールで実施されてきたように、予定された曜日と時間に MIS を投与することが現実的である。

本研究の最終的な目標は、現在のニホンウナギ催熟プロトコールに基づく最適期（ステージ 6）に、全ての雌で MIS を予定どおり投与で

きるよう、各雌の卵母細胞の成熟進行を制御する方法を開発することである。その第一歩として、本研究では、MIS 投与前の 3 日間の飼育水温操作が、卵母細胞の成熟進行に及ぼす影響を検討した。前述のように、通常、雌ウナギの催熟には、低温（15～20℃）と高温（20～23℃）での飼育が行われている。卵母細胞の成熟の進行制御をこの 2 種類の飼育水を用いて行なうことは、現状の施設でも可能であり、好都合である。そこで、雌ウナギ親魚の飼育に水温 15℃と 20℃の海水を用い、卵母細胞の成熟進行の加速と減速を検討した。

## 1. 材料と方法

### 1-1. 供試魚

販売業者から購入したシラスウナギに対し、エストラジオール-17 $\beta$ を添加した市販ウナギ用飼料（10 mg/kg 飼料）を6か月間与えて雌化し（Tachiki *et al.*, 1997）、その後、静岡県水産技術研究所浜名湖分場の淡水池において通常の市販飼料を用いて約1年6か月間通常の方法で養成した。シラスウナギの一部は、エストラジオール-17 $\beta$ を与えずに飼育し、雄親魚を得た。この雌雄親魚を海水馴致して、無給餌条件で催熟に供した。

### 1-2. 催熟

Kagawa *et al.* (1997) および Ohta *et al.* (1997) が報告した方法にそれぞれ修正を加え、雌ウナギおよび雄ウナギについて催熟を実施した。

48尾（実験中1尾死亡し、47尾）の雌（703 $\pm$ 174 g、平均 $\pm$ 標準偏差）を4基の2000 L循環水槽に収容し、海水15 $^{\circ}$ Cで飼育した。雌ウナギには毎週月曜日にSPE（20 mg/kg-BW）を腹腔内投与し飼育した。また、毎週注射前に体重を測定し、以下の式で比体重を算出した。

$$\text{比体重 (\%)} = \text{体重} \times 100 / \text{ホルモン処理開始時体重}$$

雄ウナギには毎週月曜日にヒト絨毛性ゴナドトロピン（2000 IU/kg 体重）を腹腔内注射し、催熟した。排精した雄から精子を繰り返し得て、人工精漿（Ohta and Izawa, 1996）で100倍に希釈し、3週間以内に人工受精に使用した。使用前に顕微鏡を用いて、精子の運動活性を評価した。



ホルモン注射や配偶子採取の際には、雌雄のウナギは海水に溶かした 2-フェノキシエタノール (1 mL/L) で麻酔をかけた。

### 1-3. 油球ステージの判定と卵母細胞径の測定

各雌の成熟状態を評価するため、カニューレーションにより採取した卵母細胞を 0.9% NaCl 中にて実体顕微鏡で観察し、写真を撮影した。最も成熟が進んだ状態の卵母細胞の中から 15 個の卵母細胞を無作為に選び、油球ステージの判定に使用するとともに、各卵母細胞について、画像計測ソフトを用いて長径と短径を測定し、平均した値を卵母細胞径とした。各卵母細胞における油球の状態は、第IV章第 1 節に従ってステージ 1~10 に分類し、15 個の卵母細胞の中央値をその個体のステージと定義した。

### 1-4. 孵化実験

採卵した中から 2 g の卵を計り取り、人工精漿で希釈した精液 1 mL (精子運動率 50%以上) を媒精した後、100 mL 中約 30 mL の海水を入れて人工授精を行い、約 1 分経過した後、100 mL のビーカーに戻した。駒込ピペットで海水をポンピングし、よく攪拌した後、任意に受精卵ごと海水 1 mL を 3 回計り取り、シャーレに入れた。これに含まれる約 120 個の卵を用いて、48 ウェル組織培養マイクロプレートを用いた個別飼育法 (Unuma *et al.*, 2004) で孵化率を評価し、受精卵を入れたマイクロプレートは 25°C で培養した。孵化率は人工授精から 3 日後に計数した。この値は、各雌について以下の式で算出した。

孵化率 (%) =  $100 \times (\text{孵化仔魚の数}) / (\text{マイクロプレートに収容された受精卵の数})$

#### 1-5. 統計解析

データは特に指定がない限り、平均値±標準偏差で表した。実験 3 の孵化率等の群間の差を調べるために、BellCurve for Excel version 2.0 (Social Survey Research Information Co., Ltd; Tokyo, Japan) を用いて、一元配置分散分析の後、Tukey-Kramer 検定を行なった。統計的有意性は  $p < 0.05$  とした。

#### 1-6. 水温による最終成熟速度の調節

—月曜日油球ステージ 2 の場合—

##### 1-6-1. 成熟加減法による油球ステージと卵径の推移

月曜日に初めて比体重 110% を超え、かつ油球ステージ 2 だった個体について、月曜日の SPE 投与から、木曜日 17 $\alpha$ -OHP 投与前の 3 日間において、20/20 $^{\circ}$ C, 20/15 $^{\circ}$ C, 15/20 $^{\circ}$ C, 15/15 $^{\circ}$ C でランダムに飼育した雌ウナギの卵母細胞の油球ステージの推移を調べた。また、月曜日から木曜日の夕方までの平均卵母細胞径の変化を調べた。実験スケジュールは図 15A の通りである。

##### 1-6-2. 各試験区の孵化率と油球ステージ

17 $\alpha$ -OHP 投与前に 15 $^{\circ}$ C または 20 $^{\circ}$ C で 3 日間飼育した雌ウナギから得られた卵について人工授精を行い、孵化率を測定した。

## 1-7. 油球ステージに応じた水温選択による最終成熟速度の調節

### －月曜日油球ステージ 2 と 3 の場合－

#### 1-7-1. ステージに応じた成熟加減法による油球ステージと卵径の推移

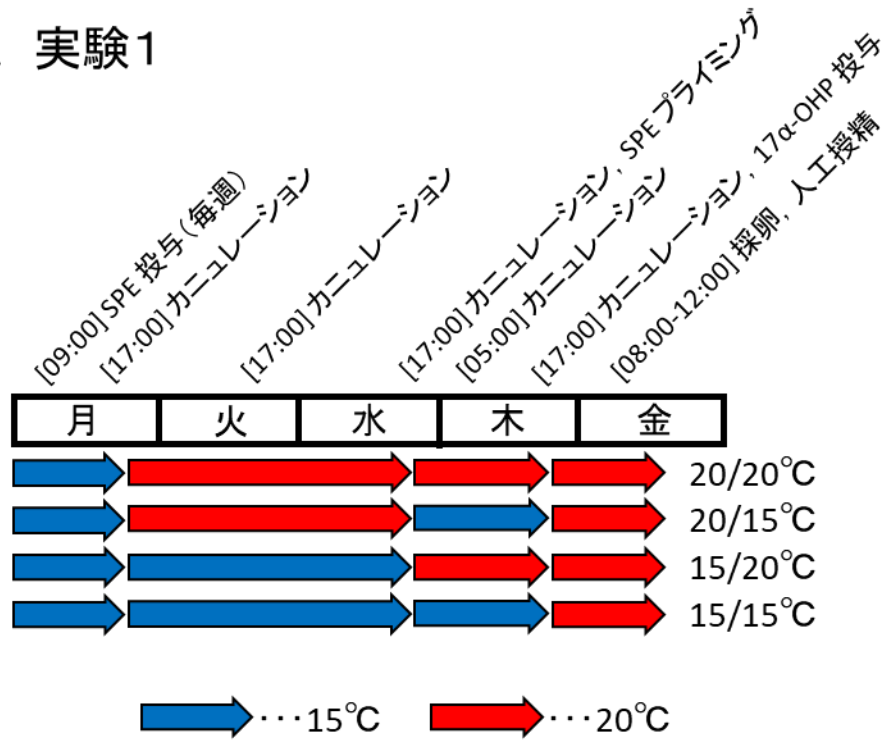
月曜日に初めて比体重 110%を超え、かつ油球ステージが 2 または 3 だった個体について、月曜日の SPE 投与から水曜日の SPE プライミングまで、油球ステージ 2 だった個体は水温 20℃で、油球ステージ 3 だった個体は水温 15℃で飼育し、各個体の油球ステージの推移と卵母細胞径を測定した。

さらに、水曜日の油球ステージに応じて、油球ステージ 4 以下の個体は水温 20℃で、油球ステージ 5 以上の個体は水温 15℃で木曜日夕方にかけて継続飼育し、各個体の油球ステージの推移と卵母細胞径を測定した。実験スケジュールは図 15B の通りである。

#### 1-7-2. 各試験区の孵化率と油球ステージの分布

月曜日から木曜日まで 20/20 ℃，20/15 ℃，15/20 ℃，15/15 ℃で飼育した雌ウナギから得られた卵について人工授精を実施し、孵化率の平均値と、油球ステージと孵化率の分布を測定した。

## A 実験1



## B 実験2

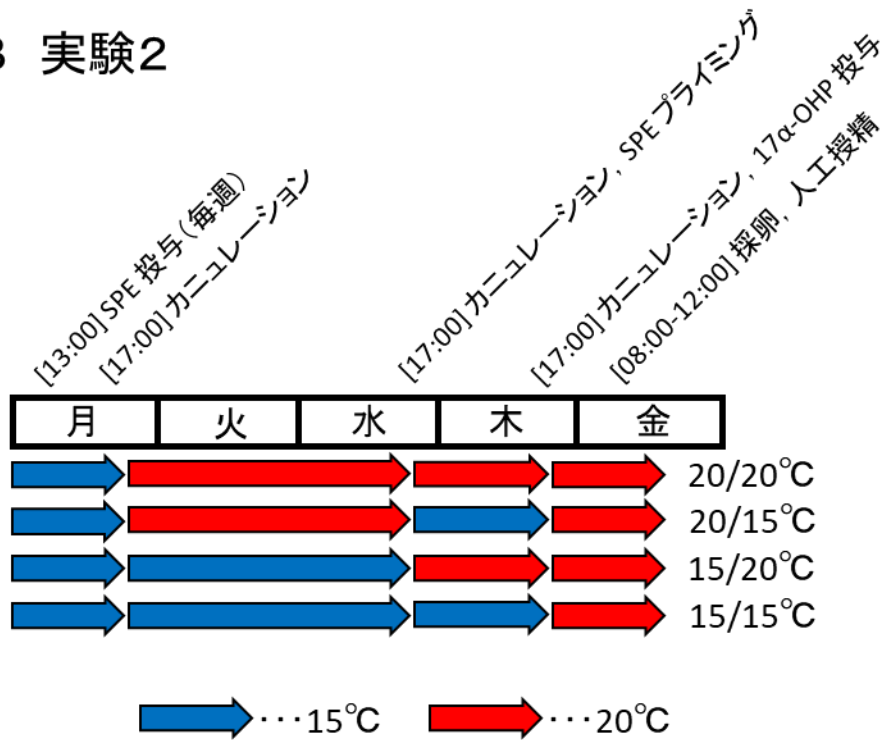


図15. 実験スケジュール

## 2. 結果

### 2-1. 水温による最終成熟速度の調節

－月曜日油球ステージ 2 の場合－

#### 2-1-1. 成熟加減法による油球ステージと卵径の推移

図 16 は、月曜日の SPE 投与から、木曜日 17 $\alpha$ -OHP 投与前の 3 日間において、20/20 $^{\circ}$ C、20/15 $^{\circ}$ C、15/20 $^{\circ}$ C、15/15 $^{\circ}$ C でランダムに飼育した雌ウナギの卵母細胞の油球ステージの推移を示したものである。

月曜日から水曜日にかけて、20 $^{\circ}$ C で飼育された雌（20/20 $^{\circ}$ C 群、20/15 $^{\circ}$ C 群）の一部はステージ 5 まで進行し、15 $^{\circ}$ C で飼育された雌（15/20 $^{\circ}$ C 群、15/15 $^{\circ}$ C 群）は最大でステージ 4 まで進行していることがわかった。水曜日から木曜日の夕方にかけて、20 $^{\circ}$ C で連続飼育された雌（20/20 $^{\circ}$ C 群）はステージ 6 に達していたのに対し、20 $^{\circ}$ C から 15 $^{\circ}$ C に飼育水温を低下させ飼育された雌（20/15 $^{\circ}$ C 群）では最大でもステージ 5 であった。しかし、15 $^{\circ}$ C から 20 $^{\circ}$ C に飼育水温を上昇させ飼育した雌（15/20 $^{\circ}$ C 群）はステージ 4～6 まで進んだのに対し、15 $^{\circ}$ C で連続飼育した雌（15/15 $^{\circ}$ C 群）はステージ 3～5 であった。

月曜日から木曜日の夕方までの油球ステージの中央値の変化を図 17 に示した。月曜日の夕方には、全グループの中央値はステージ 2 であった。20/20 $^{\circ}$ C の中央値は、火曜日の夕方にステージ 3、水曜日の夕方にステージ 4、木曜日の朝にステージ 6 と進み、木曜日の夕方までステージ 6 に留まった。20/15 $^{\circ}$ C 群の中央値は水曜日の夕方までは 20/20 $^{\circ}$ C 群と同様であったが、15 $^{\circ}$ C に移行後、木曜日の朝までステージ 4 で、木曜日の夕方にはステージ 5 に進んだ。15/20 $^{\circ}$ C 群の中央値は、火曜日夕方までステージ 2 であったが、水曜日夕方にステージ 3.25、

木曜日朝にステージ 5 となり，木曜日夕方までステージ 5 であった。15/15℃群の中央値は，水曜日の夕方までは 15/20℃群と同様であったが，木曜日の朝までステージ 3 に留まり，木曜日の夕方にはステージ 4 に進んだ。

月曜日から木曜日の夕方までの平均卵母細胞径の変化を図 18 に示した。20/20℃，20/15℃，15/20℃，15/15℃群の平均直径は，月曜日の夕方にそれぞれ  $765.3 \pm 6.4$ ， $781.4 \pm 33.7$ ， $780.8 \pm 22.5$ ， $784.0 \pm 13.9$   $\mu\text{m}$  から  $862.9 \pm 20.9$ ， $885.9 \pm 31.9$ ， $856.0 \pm 22.0$ ， $867.1 \pm 25.0$   $\mu\text{m}$  に，水曜日の夕方には  $949.4 \pm 8.7$ ， $959.3 \pm 17.2$ ， $963.2 \pm 28.7$ ，および  $947.7 \pm 19.2$   $\mu\text{m}$  に，木曜日の夕方にはそれぞれ  $949.4 \pm 8.7$ ， $959.3 \pm 17.2$ ， $963.2 \pm 28.7$ ，そして  $947.2$   $\mu\text{m}$  と増加した。

月曜日から木曜日の夕方までの卵母細胞径の増加率を図 19 に示した。月曜日から水曜日までの増加率は，20/15℃ ( $13.5 \pm 4.2\%$ )，20/20℃ ( $12.8 \pm 3.7\%$ )，15/15℃ ( $10.6 \pm 3.2\%$ )，15/20℃ ( $9.7 \pm 3.4\%$ ) グループの順で高かった。20℃で飼育した雌 (20/15℃群および 20/20℃群) の増加率は 15℃で飼育した雌 (15/15℃群および 15/20℃群) のそれよりも高かったが，群間で統計的に有意な差はなかった。水曜日から木曜日にかけての卵母細胞径の増加率は，15/20℃群 ( $12.6 \pm 3.6\%$ )，20/20℃群 ( $10.1 \pm 2.4\%$ )，15/15℃群 ( $9.3 \pm 2.2\%$ )，20/15℃群 ( $8.4 \pm 4.1\%$ ) の順で高かった。20℃で飼育した雌 (15/20℃群および 20/20℃群) の増加率は 15℃で飼育した雌 (15/15℃群および 20/15℃群) の増加率よりも高かったが，群間で統計的に有意な差はなかった。

これらの油球ステージと卵母細胞径の変化から，飼育水温の変化に

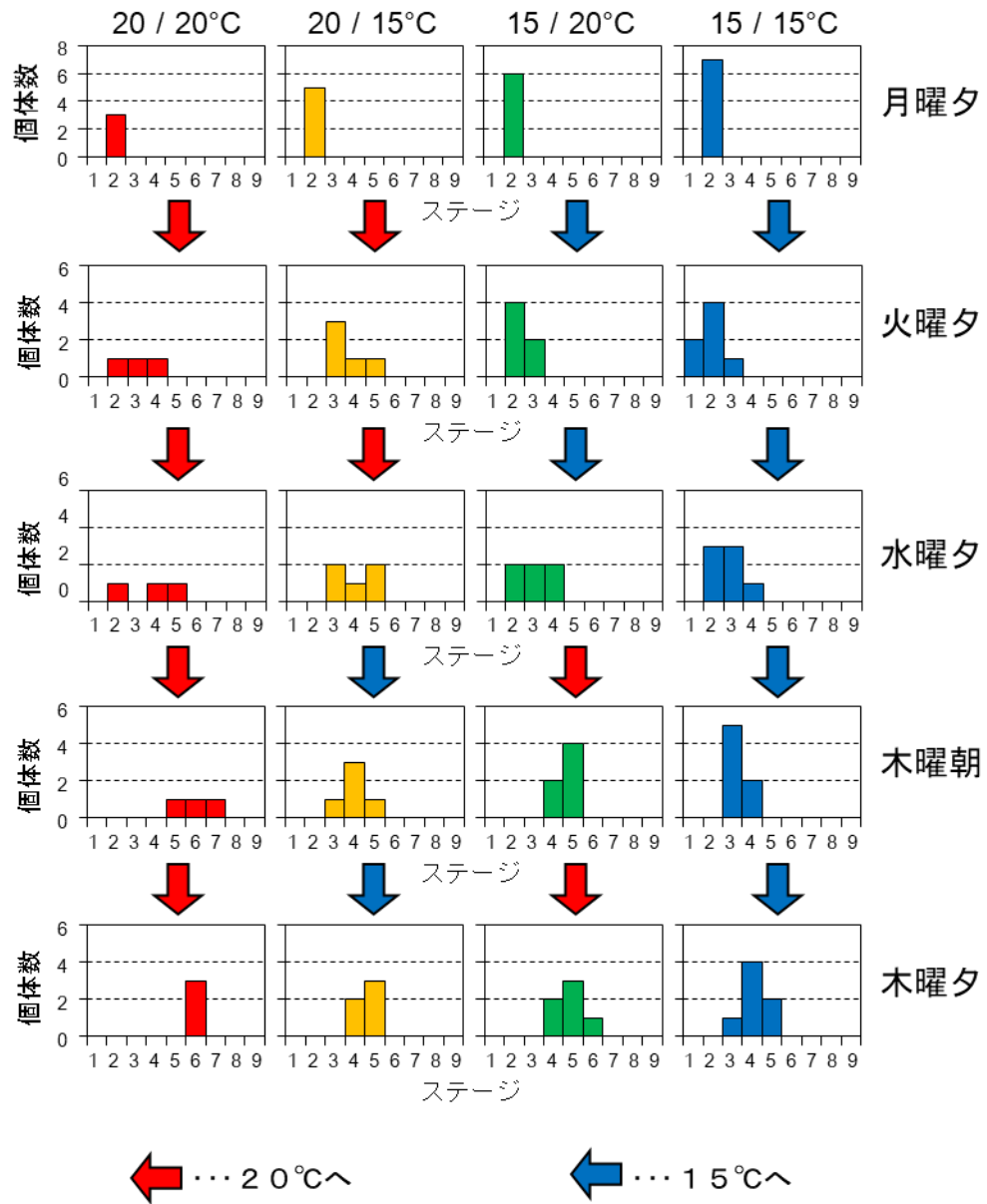


図16. 月曜日から木曜日まで4通りの飼育水温で飼育した場合の卵母細胞の油球ステージの推移

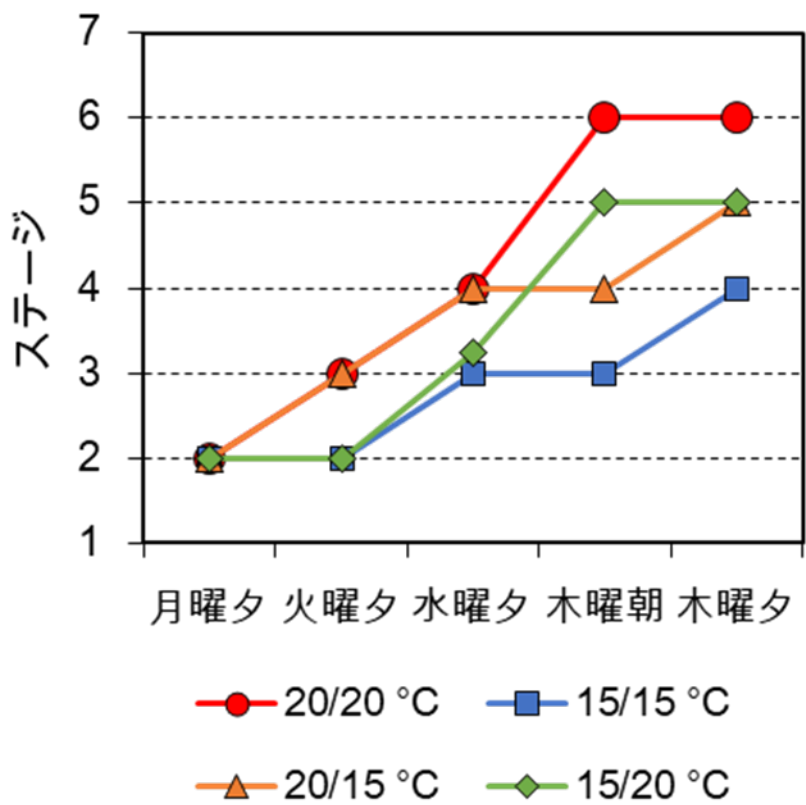


図17. 月曜日から木曜日までの油球ステージの中央値の推移



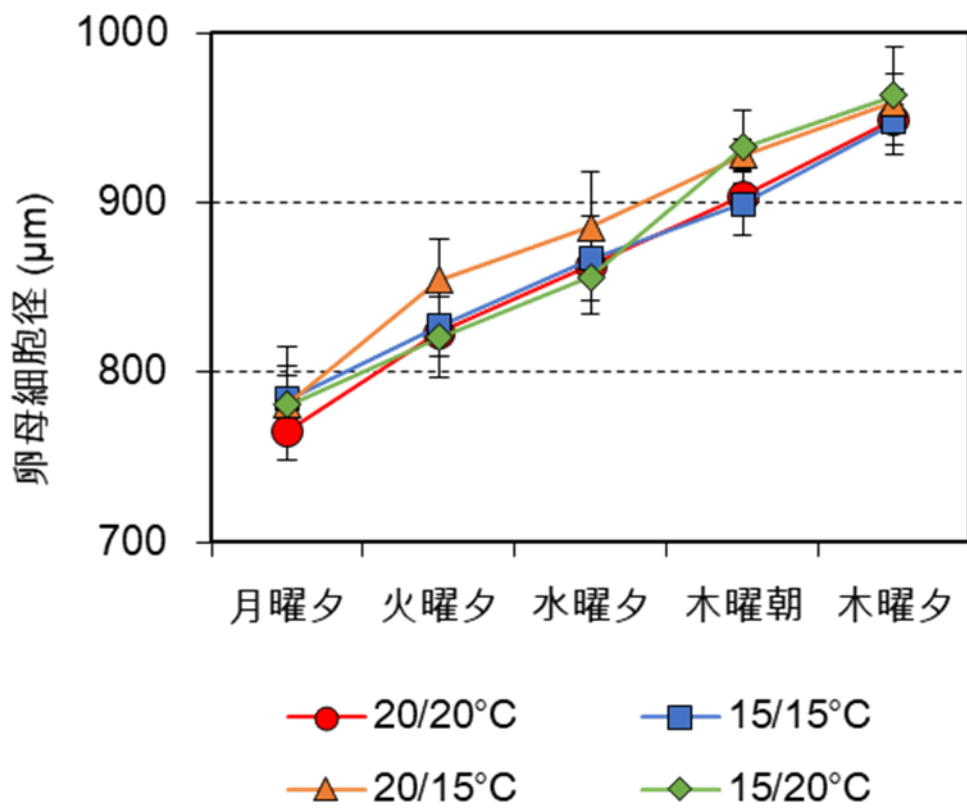


図18. 月曜日から木曜日までの平均卵母細胞径の推移

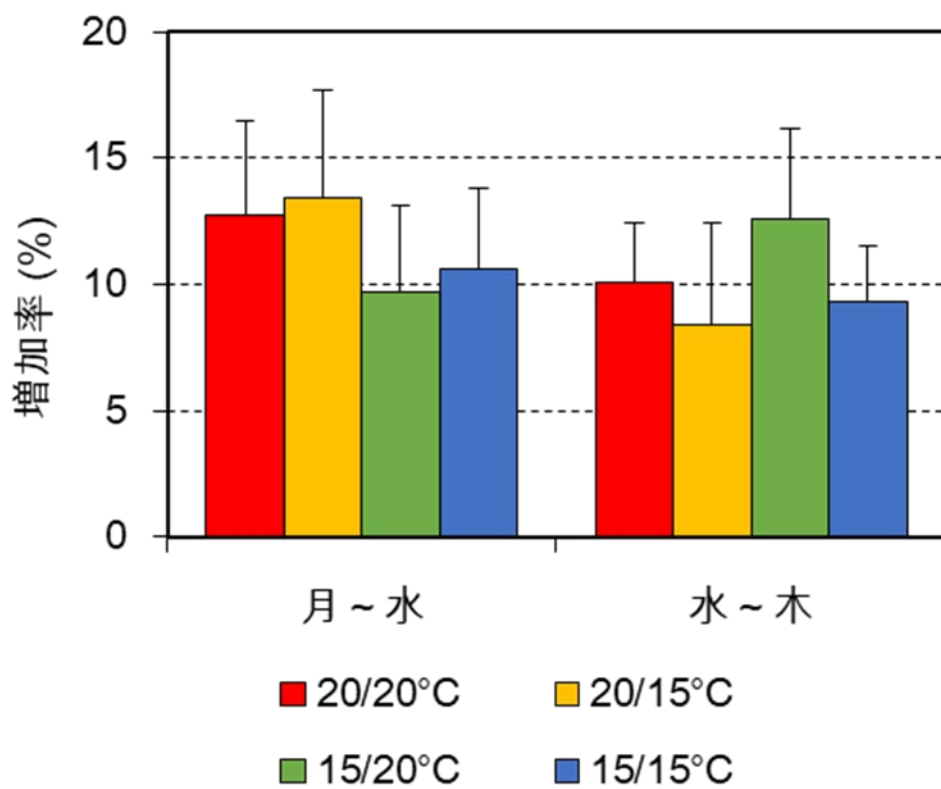


図19. 月曜日から木曜日までの卵母細胞径の増加率

関わらず、成熟は 15℃よりも 20℃の方が早く進行することがわかった。

#### 2-1-2. 各試験区の孵化率と油球ステージ

図 20 は、17 $\alpha$ -OHP 注射前に 15℃または 20℃で 3 日間管理した雌ウナギから得られた卵の孵化率を示した。孵化率は、20/20℃ (35.9 $\pm$ 46.6%)、20/15℃ (21.5 $\pm$ 31.3%)、15/20℃ (10.7 $\pm$ 24.2%)、15/15℃ (0.8 $\pm$ 2.0%) グループの順で高かった (図 20A)。20℃で飼育した日数が少ない群では孵化率が低かったが、群間で有意な差はなかった。17 $\alpha$ -OHP 注射時の油球ステージと孵化率の関係を図 20B に示した。20℃での飼育日数が少ないほど、ステージ 3-4 の雌の数が多く、孵化率は低かった (20%未満)。

#### 2-2. 油球ステージに応じた水温選択による最終成熟速度の調節

##### －月曜日油球ステージ 2 と 3 の場合－

##### 2-2-1. ステージに応じた成熟加減法による油球ステージと卵径の推移

図 21 は、月曜日から木曜日まで、水温 15℃と 20℃で飼育された雌ウナギの卵母細胞の成熟経過を、月曜日と水曜日の夕方の個々の油球ステージに応じて示したものである。

月曜日から水曜日にかけて、20℃と 15℃の双方で飼育された雌は油球ステージ 3-5 に進行した。水曜日から木曜日の夕方にかけて、20℃で連続飼育した 24 尾の雌親魚 (20/20℃群) はステージ 4~8 に進行し、その中でもステージ 5 が最も多くなっていた。さらに、20℃から 15℃に飼育水温を低下させて飼育した 3 尾の雌 (20/15℃群)、15℃から 20℃

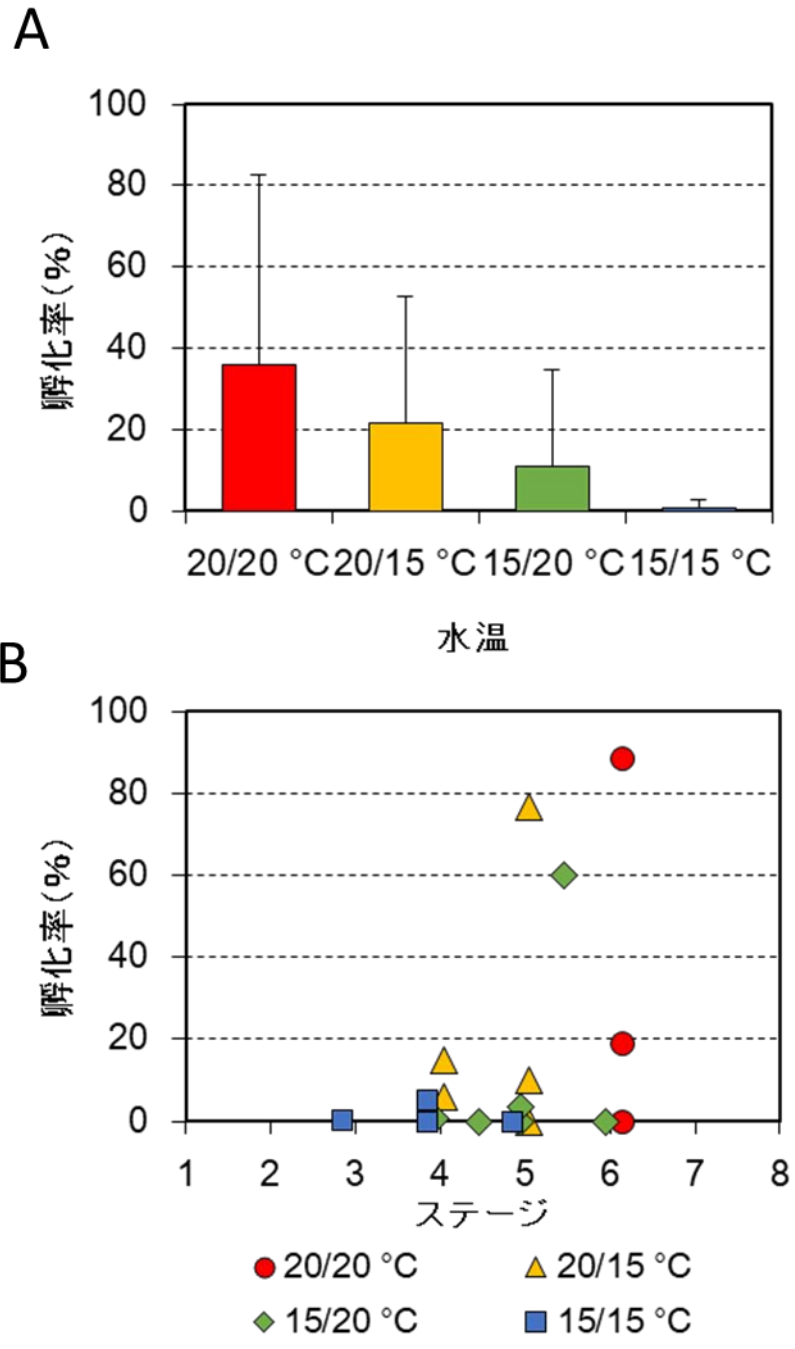


図20. 月曜日から木曜日まで4通りの飼育水温で飼育した雌から得られた卵の孵化率の関係

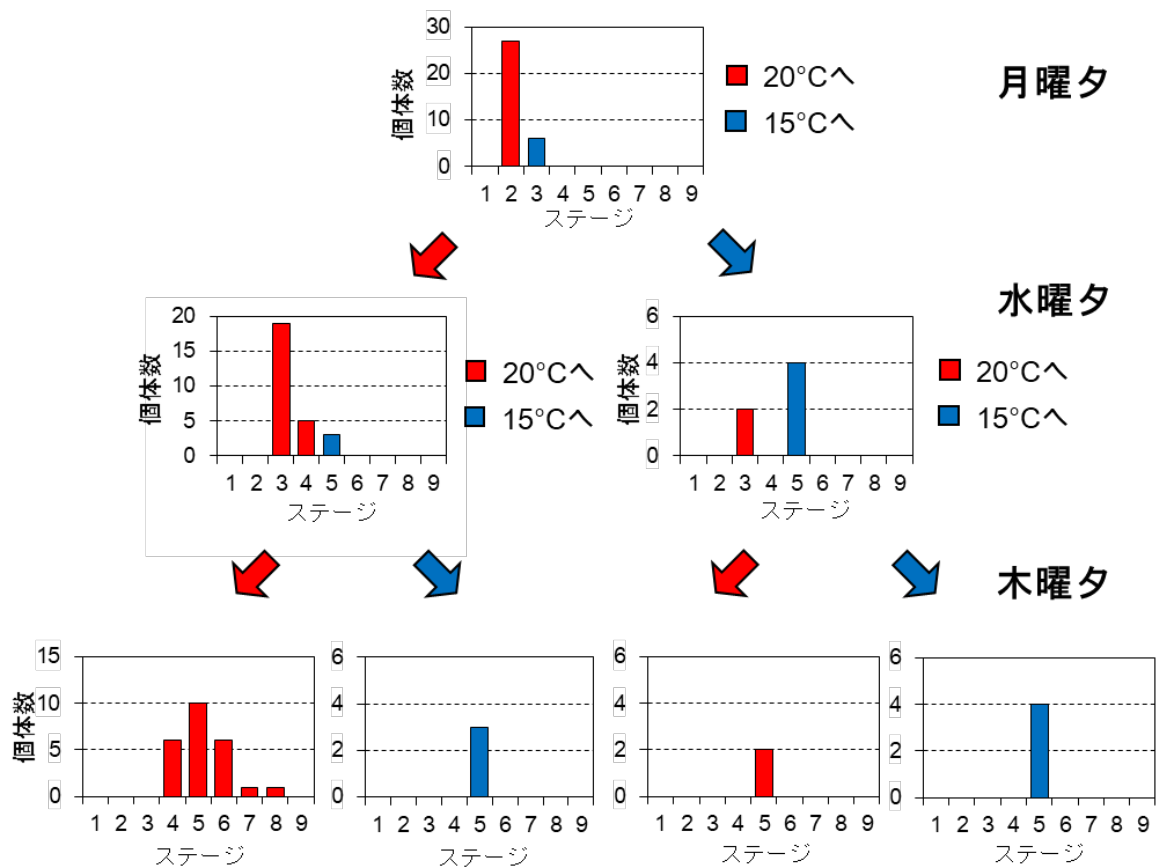


図21. 月曜日から水曜日までと水曜日から木曜日までを  
2通りの飼育水温で飼育した雌から得られた  
卵母細胞の油球ステージの推移

で飼育水温を上昇させて飼育した 2 尾の雌 (15/20℃群), 15℃で連続飼育した 4 尾の雌 (15/15℃群) はすべてステージ 5 へ移行した。

月曜日から水曜日までの油球ステージ中央値, 平均卵母細胞径, 卵母細胞径増加率の変化をそれぞれ図 **22A, B, C** に示す。ステージの中央値は, 20℃ではステージ 2 から 3 へ, 15℃ではステージ 3 から 5 へと進行した。平均卵母細胞径は, 20℃では  $827.1 \pm 35.4 \mu\text{m}$  から  $883.1 \pm 22.9 \mu\text{m}$  に, 15℃では  $869.5 \pm 21.6 \mu\text{m}$  から  $913.3 \pm 18.3 \mu\text{m}$  に増加した。卵母細胞径の増加率について, 20℃の場合 ( $6.9 \pm 2.5\%$ ) は 15℃の場合 ( $5.1 \pm 2.4\%$ ) より高かったが, 有意差はなかった。

水曜日から木曜日にかけての油球ステージ中央値, 平均卵母細胞径, 卵母細胞径増加率の変化をそれぞれ図 **23A, B, C** に示した。中央値は, 20/20℃と 15/20℃の両群でステージ 3 から 5 へと進行したが, 20/15℃と 15/15℃の両群ではステージ 5 のままであった。その結果, 木曜日の夕方には全群で中央値がステージ 5 となった。平均卵母細胞径は, 20/20℃群では  $882.5 \pm 22.0 \mu\text{m}$  から  $939.3 \pm 24.1 \mu\text{m}$  に, 20/15℃群では  $887.3 \pm 35.0 \mu\text{m}$  から  $934.3 \pm 29.8 \mu\text{m}$  に, 15/20℃群では  $899.0 \pm 12.7 \mu\text{m}$  から  $958 \pm 56.6 \mu\text{m}$  に, 15/15℃群では  $920.5 \pm 17.4 \mu\text{m}$  から  $954.5 \pm 14.3 \mu\text{m}$  に, それぞれ増加した。卵母細胞径の増加率は, 15/20℃ ( $6.5 \pm 4.8\%$ ), 20/20℃ ( $6.5 \pm 2.4\%$ ), 20/15℃ ( $5.3 \pm 1.0\%$ ), 15/15℃ ( $3.7 \pm 0.5\%$ ) の順で高くなった。20℃で飼育した雌 (15/20℃群および 20/20℃群) の増加率は, 15℃で飼育した雌 (20/15℃群および 15/15℃群) より高かったが, 群間に有意差はみられなかった。

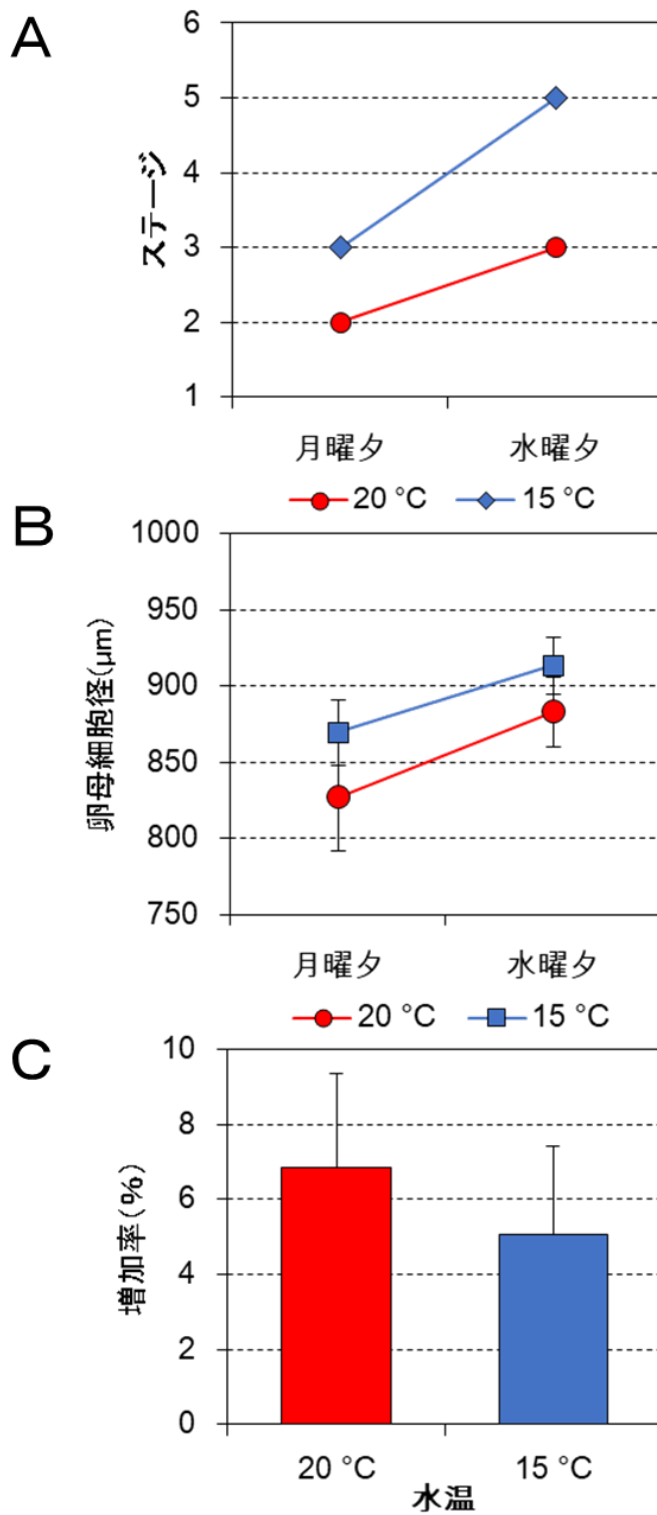


図22. 月曜日から水曜日までの油球ステージの中央値, 平均卵母細胞径, 卵母細胞径増加率の変化

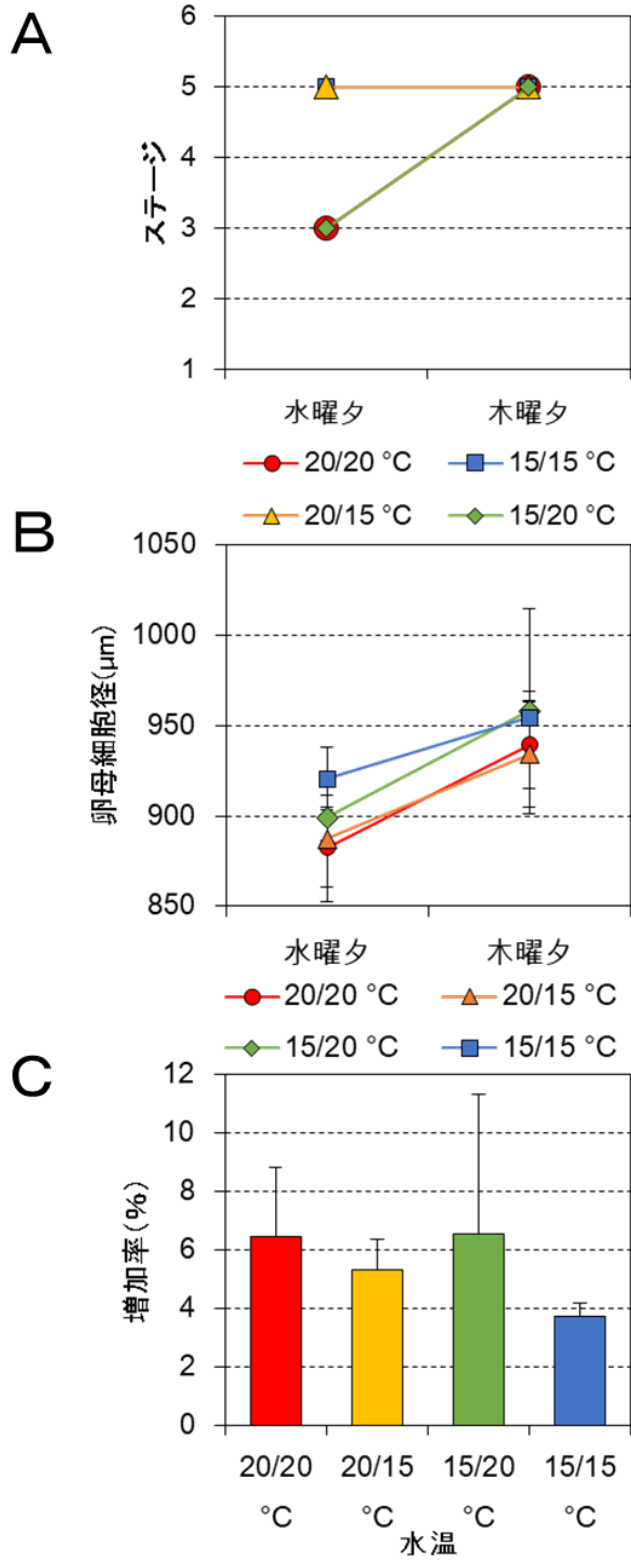


図23. 月曜日から水曜日までの油球ステージの中央値, 平均卵母細胞径, 卵母細胞径増加率の変化



この油球ステージと卵母細胞径の変化から、各雌の飼育温度（20℃または15℃）によって卵母細胞の成熟が加速・減速し、その結果、17 $\alpha$ -OHP投与時（木曜日夕方）の成熟状態（油球ステージ）はステージ5前後となることがわかった。

#### 2-2-2. 各試験区の孵化率と油球ステージの分布

図 24 は、月曜日から木曜日まで 20/20 °C、20/15 °C、15/20 °C、15/15 °C で飼育した雌ウナギから得られた卵の孵化率の平均値（図 24A）と、油球ステージと孵化率の分布（図 24B）を示したものである。20/20 °C、20/15 °C、15/20 °C、15/15 °C 群の孵化率は、それぞれ  $43.4 \pm 27.6\%$ 、 $79.9 \pm 8.0\%$ 、 $28.6 \pm 20.9\%$ 、 $67.2 \pm 32.3\%$  であり、群間で有意な差は検出されなかった。したがって、実験 1 における 20 °C でより少ない日数で飼育された雌でも、孵化率は低くないことがわかった。

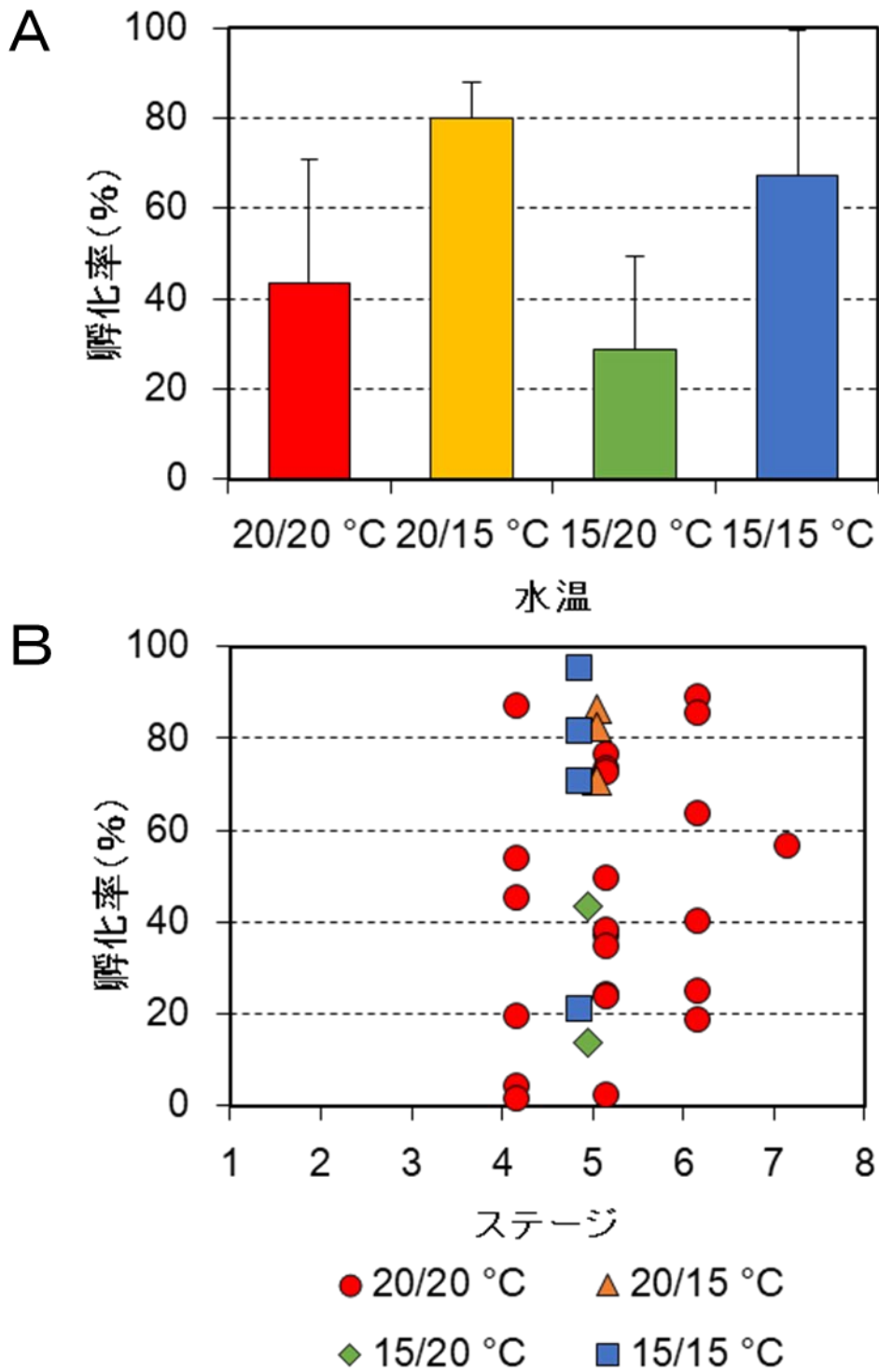


図24. 月曜日から木曜日までを4通りの飼育水温で飼育した雌から得られた卵の孵化率と油球ステージ

### 3. 考察

ニホンウナギにおいて、卵母細胞の最終成熟と排卵を誘導するための現在のプロトコールでは、核移動期の卵母細胞を持つ成熟雌に、水曜日の夕方に SPE のプライミング、木曜日の夕方に MIS 投与、金曜日の朝に採卵といった、1 週間のプログラムに基づいて SPE (プライミング) および MIS (またはその前駆体) を順次投与している (Unuma *et al.*, 2012 ; Kagawa *et al.*, 2013 ; Kazeto *et al.*, 2019)。このような 1 週間のスケジュール方式が確立されたのは、研究者が決まった曜日と時間に各処理の準備をするのに便利だからである。しかし、卵母細胞の成熟は必ずしも期待通りに進まない。そのため、不適切なタイミングで雌に MIS を投与することが多く、これが卵質低下の原因の一つとなっている (Unuma *et al.*, 2011)。そこで、本研究では、雌ウナギの成熟状態を最適化するために、曜日と時間を固定し、高温と低温で雌親魚を飼育することの可能性を検討した。その結果、15℃と 20℃で適切に飼育することで、各雌の卵母細胞の成熟の進行を加速または減速できることが明らかになった。

実験 1 では、油球ステージ 2 を持つ雌を 15℃または 20℃で飼育した。月曜日から水曜日までと水曜日から木曜日まで、15℃よりも 20℃の方が卵母細胞の成熟の進行が早かった (図 16~17)。その結果、水温 20℃で飼育した期間が短かった雌は、MIS 投与に最適なステージ 6 よりも低いステージとなり、孵化率も悪かった (図 20)。

実験 2 では、ステージ 2 および 3 の油球ステージである雌を、成熟状況に応じて 15℃または 20℃で飼育した。月曜日と水曜日には、より高いステージの卵母細胞を持つ雌が 15℃で飼育された。実験 1 と同様

に、月曜日から水曜日、水曜日から木曜日にかけては、15℃よりも20℃の方が卵母細胞の成熟の進行が速かった（図21～23）。その結果、ほとんどの雌の成熟状態は、MIS前駆体投与時にステージ5で平準化された。残念ながら、ステージ6（最適期）にMIS前駆体を投与した雌の数は限られていた。このことは、飼育水温の切り替え時（ステージ2と3を月曜日夕方、ステージ4と5を水曜日夕方）が適切でなかったことを示唆している。

全ての雌に最適なステージでMISを投与するために、各雌の卵母細胞の成熟の進行を制御する方法を開発する必要がある。今後の研究で水温15℃と20℃での雌親魚の適切な飼育方法を決定する必要がある。飼育水温15℃と20℃の切り替えのタイミングを変更すれば、ほとんどの雌を予定日時にMIS（またはその前駆体）の注射に最適なステージ（ステージ6）にすることができるかもしれない。ただし、この方法では卵黄形成および最終的な卵母細胞の成熟のためのプライミングにSPEを使用する。ウナギ属魚種の組換え生殖腺刺激ホルモンは、様々な方法を用いて合成されてきた（Kamei *et al.*, 2003; Kazeto *et al.*, 2008; Kobayashi *et al.*, 2010; Peñaranda *et al.*, 2018）。近年、ニホンウナギの組換え濾胞刺激ホルモンや黄体形成ホルモンがチャイニーズハムスター卵巢細胞株を用いて商業生産され（Kazeto and Tanaka 2020）、従来のSPEやhCG投与よりも卵形成や精子形成の誘導に有効であることが示されている（Ohta *et al.*, 2017; Kazeto and Tanaka 2020）。今後、催熟プロトコールでSPEを組換え生殖腺刺激ホルモンに置き換えた場合、卵母細胞の成熟進行に及ぼす温度の影響を再検討し、低温と高温で飼育する場合の切り替えのタイミングを変更する必

要がある。

ウナギの卵質は、他の魚類と同様に様々な要因に依存している (Kjørsvik *et al.*, 1990; Brooks *et al.*, 1997)。例えば、催熟前の雌親魚のタイプ（銀化ウナギ、雌化養成等）と環境条件は、繰り返し行われる SPE 注射に対する雌の反応性、ひいては卵質に影響を与える (Ijiri *et al.*, 1998; Okamura *et al.*, 2008; Chai *et al.*, 2010)。親魚養成中の栄養状態は、ビタミンや脂肪酸といった卵の生化学的組成に影響を与え、孵化率や仔魚の生残率を変化させる (Furuita *et al.*, 2003, 2006, 2007, 2009; Yamamoto *et al.*, 2011)。さらに、ウナギの卵は排卵後急速に過熟するため、排卵から授精までの時間が受精率や孵化率に強く影響する (Ohta *et al.*, 1996; Unuma *et al.*, 2012)。したがって、卵質は卵母細胞の最終成熟と排卵誘発のタイミングに完全に依存するわけではない。図 20 および 24 に示すように、同じ時期に MIS 前駆体を投与した雌でも、実験 1 では実験 2 よりも孵化率が悪かった。実験 1 の卵質は、催熟前の環境条件など、上述のいくつかの理由によって低下した可能性がある。さらに、MIS 前駆体をステージ 6 で投与した雌から得られた卵の一部は、両実験で孵化率が悪かったが、これも上記の何らかの理由によるものと考えられる。

飼育下でウナギ属魚類から得られる卵質が低いことは、これら魚類の増殖方法を開発するために取り組むべき世界的な緊急の課題である (Damsteegt *et al.*, 2020; Kottmann *et al.*, 2020)。数十年前から、ヨーロッパウナギ *A. anguilla* (Müller *et al.*, 2003; Pedersen 2004; Di Biase *et al.*, 2017), ニュージーランドウナギ *A. australis* (Lokman and Young 2000; Lokman *et al.*, 2015), およびアメリカウナギ *A.*

*rostrata* (Oliveira and Hable 2010) などの様々なウナギ種で催熟に関する研究が盛んに行われてきた。雌の成熟を誘導するために、ニホンウナギと同様のプロトコールが用いられたが、不安定な卵質が共通の対処すべき問題となっている。これらの種のうち、*A. anguilla* では、MIS 投与時間が卵質に及ぼす影響について、油球を指標として検討されている (Palstra *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2018)。da Silva ら (2018) は、質の高い卵を産むヨーロッパ雌ウナギから得られた卵母細胞の油球の直径の範囲は、MIS 投与時に 117~160  $\mu\text{m}$  で、ニホンウナギでのステージ 6 (90~110  $\mu\text{m}$ ) と比較して大きいことを報告している。このことは、卵母細胞の最終成熟と排卵を誘導するための最適な成熟状態が、種によって異なることを意味している。今後、MIS 投与の最適なタイミングや卵母細胞の成熟の進行に及ぼす温度の影響が種ごとに明らかになれば、高低温飼育により卵母細胞の成熟の進行の偏りを平準化するこの方法は、他のウナギ属魚種でも利用できる可能性がある。

以上のことから、各雌を 15°C または 20°C で飼育することにより、卵母細胞の成熟の進行の偏りを是正し、卵母細胞の成熟の進行を加速または減速させることができた。週 1 回の SPE 注射と排卵誘発に必要な低温 (15°C 前後) と高温 (20°C 前後) でそれぞれ飼育すれば、特定の温度で追加飼育する必要はない。今後の研究で低温飼育と高温飼育の適切な切り替え時期を決定した上で、ほとんどの雌を MIS 投与に最適な成熟期 (ステージ 6) にすることが可能と考えられる。

### 第 3 節 油球ステージ法の完成

第IV章第 1 節において，新たなバイオマーカーとして卵母細胞の油球に着目し，成熟の進行に応じて融合していくその径を油球ステージとして 10 段階に定義した。

そして，過去の事例から，孵化率 80%以上の成績が得られている場合を解析したところ，油球ステージ 6 で排卵誘発を行い，油球ステージ 7 で人工授精を行なっていることが分かった。

第IV章第 2 節では，油球の融合は，飼育水温が高ければ（20℃）早く進み，低ければ（15℃）ゆっくり進む事が分かった。

そこで，カニューレーションによる油球ステージの判定を，毎週 SPE を投与する月曜日と，プライミングを行なう水曜日の 2 回設定し，その時の油球ステージに応じて，20℃と 15℃の 2 種の飼育水温を使い分けることにより，排卵誘発処理の木曜日に，目的の油球ステージ 6 に誘導できる可能性を示した(図 25)。一方，月曜日に行なう第 1 回目の油球ステージ判定では，そのほとんどがステージ 2 であることが分かった。

以上のことから，一定条件下における第 1 回目の油球ステージ出現頻度の測定や，油球ステージ別の 1 週間後のステージ推移を測定することにより，より簡単な油球ステージ誘導法を見出し，油球ステージ法の完成を目指す。

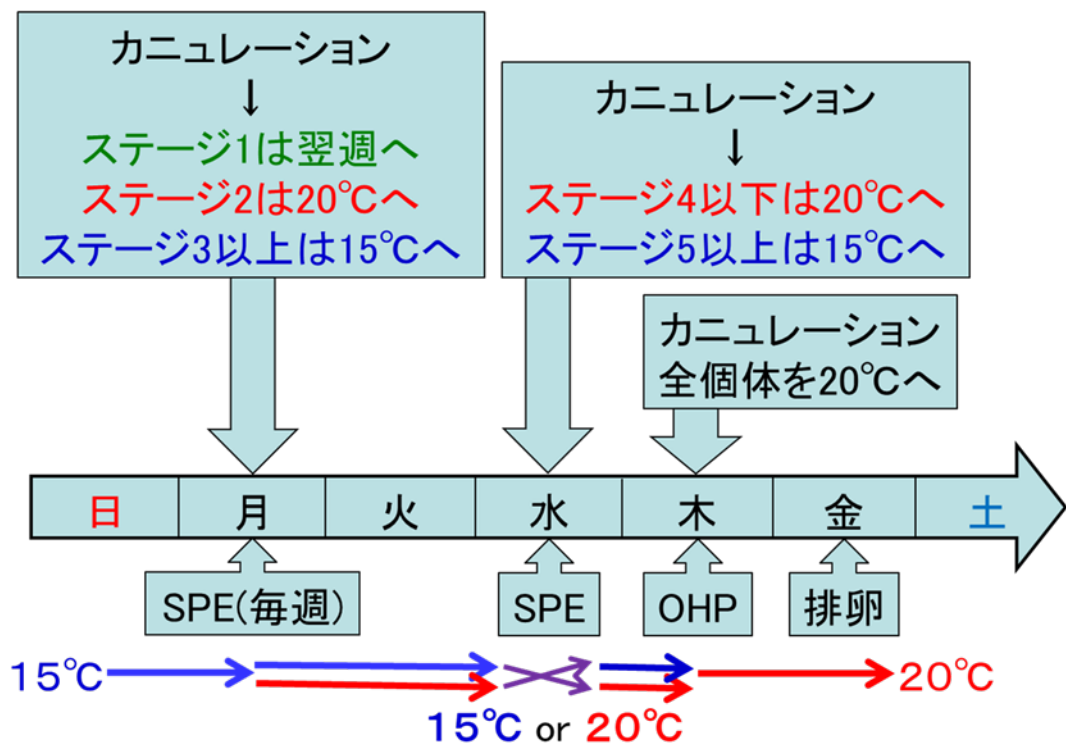


図25. 第IV章第2節までに考えられたプロトコール



## 1. 材料と方法

### 1-1. 供試魚

販売業者から購入したシラスウナギに対し，エストラジオール-17 $\beta$ を添加した市販ウナギ用飼料（10 mg/kg 飼料）を6か月間与えて雌化し（Tachiki *et al.*, 1997），その後，静岡県水産技術研究所浜名湖分場の淡水池において通常の市販飼料を用いて約1年6か月間通常の方法で養成した。シラスウナギの一部は，エストラジオール-17 $\beta$ を与えずに飼育し，雄親魚を得た。この雌雄親魚を海水馴致して，無給餌条件で催熟に供した。

### 1-2. 催熟

Kagawa *et al.* (1997) および Ohta *et al.* (1997) が報告した方法にそれぞれ修正を加え，雌ウナギおよび雄ウナギについて催熟を実施した。

実験1では53尾の雌（714 $\pm$ 182 g，平均 $\pm$ 標準偏差，以下同様）を，実験2と3では，並行して行なっていた同様の成熟方法を行なった他の試験の個体19尾を追加した74尾（697 $\pm$ 175g）を，4基の2000 L循環水槽に収容し，海水15 $^{\circ}$ Cで飼育した。雌ウナギには毎週月曜日にSPE（20 mg/kg-BW）を腹腔内投与し飼育した。また，毎週注射前に体重を測定し，以下の式で比体重を算出した。

$$\text{比体重 (\%)} = \text{体重} \times 100 / \text{ホルモン処理開始時体重}$$

雄ウナギには毎週月曜日にヒト絨毛性ゴナドトロピン（2000

IU/kg-BW) を腹腔内注射し、成熟を誘導した。排精した雄から精子を繰り返し得て、人工精漿 (Ohta and Izawa, 1996) で 100 倍に希釈し、3 週間以内に人工受精に使用した。使用前に顕微鏡を用いて、精子の運動活性を評価した。

ホルモン注射や配偶子採取の際には、雌雄のウナギは海水に溶かした 2-フェノキシエタノール (1 mL/L) で麻酔をかけた。

実験 1 では、飼育水温 15°C において SPE の反復投与を行なった。第 1 回目の SPE 投与前の体重から、月曜日の SPE 投与時に比体重が 110% に達し、かつその週の水曜日に比体重が 120% に達していた雌ウナギについて、水曜日に油球ステージを判定した。油球ステージの判定には、カニューレーションによって生殖腺から卵母細胞を採取し、採取した卵母細胞から任意に 15 粒抽出し判定した。この時、油球ステージが 2, 3, 4 の個体を次の実験 2 に使用した。

実験 2 は、実験 1 と実験 2 で追加した油球ステージ 2, 3, 4 だった個体について、1 週間後の水曜日に再度卵母細胞を実験 1 と同様に採取し、同様の方法で油球ステージを判定して、油球ステージの推移を観察した。

実験 3 は、出現した油球ステージ 5 の 16 尾について、水曜日の SPE プライミング後、任意に飼育水温 15°C と 20°C の試験区に分けて、木曜日の排卵誘発時の油球ステージを判定するとともに、金曜日の排卵後、卵を人工授精に供し、ふ化率を調べた。

### 1-3. 油球ステージの測定

各雌の成熟状態を評価するため、カニューレーションにより採取した卵母細胞を 0.9% NaCl 中にて実体顕微鏡で観察し、写真を撮影した。最も成熟が進んだ状態の卵母細胞の中から 15 個の卵母細胞を無作為に選び、油球ステージの判定に使用した。各卵母細胞における油球の状態は、第IV章第1節に従ってステージ 1~10 に分類し、15 個の卵母細胞の中央値をその個体のステージと定義した。

### 1-4. 孵化実験

採卵した中から 2 g の卵を計り取り、人工精漿で希釈した精液 1 mL (精子運動率 50% 以上) を媒精した後、100 mL 中約 30 mL の海水を入れて人工授精を行い、約 1 分経過した後、100 mL のビーカーに戻した。駒込ピペットで海水をポンピングし、よく攪拌した後、任意に受精卵ごと海水 1 mL を 3 回計り取り、シャーレに入れた。これに含まれる約 120 個の卵を用いて、48 ウェル組織培養マイクロプレートを用いた個別飼育法 (Unuma *et al.*, 2004) で孵化率を評価し、受精卵を入れたマイクロプレートは 25°C で培養した。孵化率は人工授精から 3 日後に計数した。この値は、各雌について以下の式で算出した。

孵化率 (%) =  $100 \times (\text{孵化仔魚の数}) / (\text{マイクロプレートに収容された受精卵の数})$

### 1-5. 統計解析

データは特に指定がない限り、平均値±標準偏差で表した。実験 3 の

ふ化率等の群間の差を調べるために、BellCurve for Excel version 2.0 (Social Survey Research Information Co., Ltd; Tokyo, Japan) を用いて、Mann-Whitney の U 検定を行なった。統計的有意性は  $p < 0.05$  とした。

## 2. 結果

### 2-1. 水温 15°C で SPE を反復投与して比体重 120% になった時の油球ステージの分布

図 26A に、水温 15°C で毎週月曜日に SPE を反復投与し、初めて月曜日に比体重 110% に達し、かつ水曜日に比体重 120% を超えた個体の油球ステージの分布を示した。53 尾中条件を満たした個体は 47 個体で、そのうちの 53.2% にあたる 25 尾が油球ステージ 3 となり一番多かった。次に、23.4% にあたる 11 尾が油球ステージ 4、19.1% にあたる 9 尾が油球ステージ 2 となり、この 3 つのステージで全体の 95.7% を占めた。残りの 4.3% にあたる 2 尾が油球ステージ 5 となった。

### 2-2. 油球ステージ 2 から 4 の個体が SPE 投与後水温 15°C で飼育した場合の 1 週間後の油球ステージの分布

図 26B に、水曜日に油球ステージ 2 だった個体 11 尾について、翌週の月曜日に再び SPE を投与して、水曜日に各個体の油球ステージを測定した。その結果、11 尾中 7 尾がステージ 3 に進み、3 尾がステージ 4 に進んだ。1 尾のみがステージ 2 のままだった。

図 26C に、水曜日に油球ステージ 3 だった個体 42 尾について、翌週の月曜日に再び SPE を投与して、水曜日に各個体の油球ステージを測定した。その結果、42 尾中 23 尾がステージ 4 に進み、6 尾がステージ 5 に進んだ。12 尾がステージ 3 のままとなり、1 尾はステージ 2 と判定された。

図 26D に、水曜日に油球ステージ 4 だった個体 15 尾について、翌週の月曜日に再び SPE を投与して、水曜日に各個体の油球ステージを

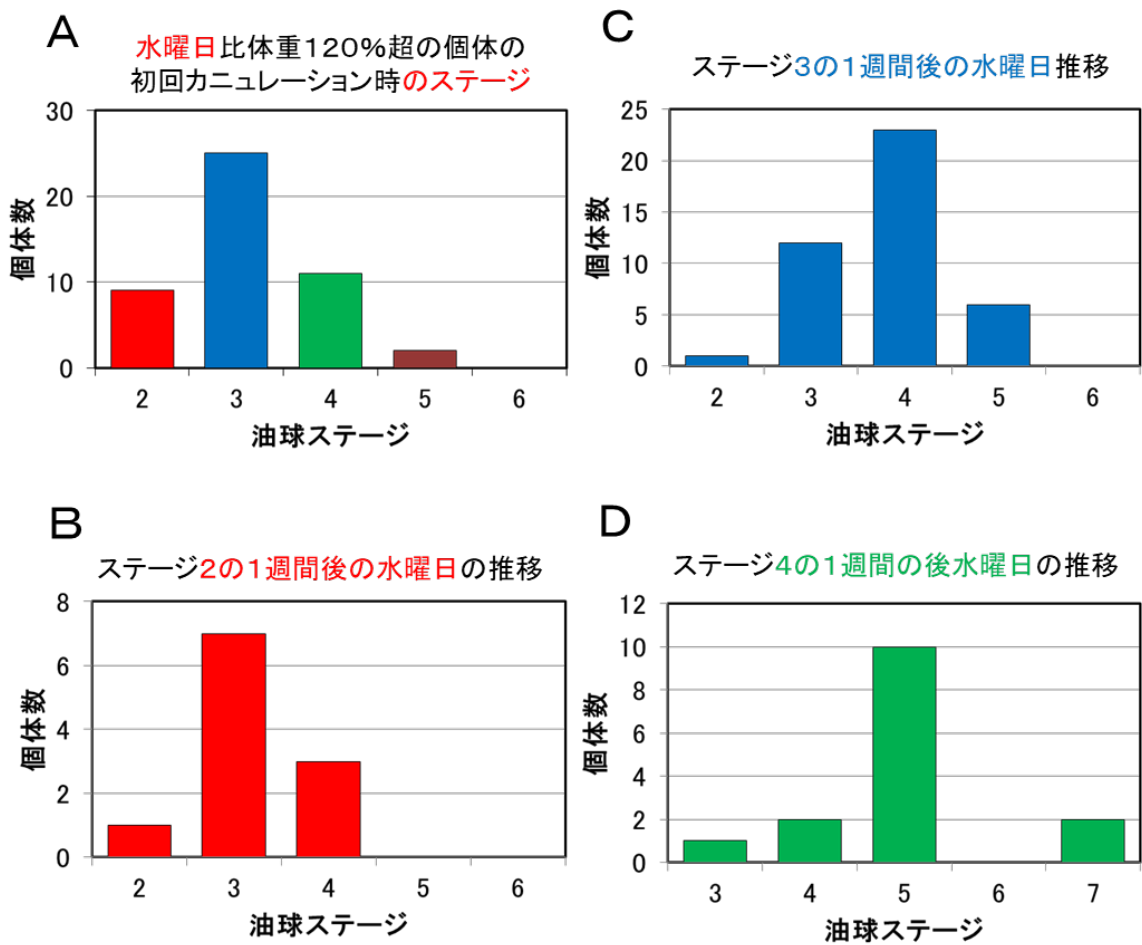


図26. 水温15°CでSPEを反復投与したときのステージ進行

測定した。その結果、15尾中10尾がステージ5に進み、2尾がステージ7に進んだ。2尾がステージ4のままとなり、1尾はステージ3と判定された。

### 2-3. 油球ステージ5の個体をプライミング後水温15℃と20℃で24時間飼育した場合の油球ステージの推移と孵化率

図27Aに、水曜日に油球ステージ5だった16尾について、SPE追加投与後水温15℃と20℃で1日飼育した後の油球ステージの分布を示した。15℃で飼育した8尾のうち、5尾はステージ5のままと判定され、3尾がステージ6に進んだ。一方20℃で飼育した8尾は、1尾はステージ5のままと判定されたが、2尾がステージ6に進み、5尾がステージ7まで進んだ。図27Bに金曜日の人工授精後に測定した孵化率を示した。15℃で飼育した群は、平均 $25.7\pm 22.3\%$ 、20℃で飼育した群は、平均 $9.7\pm 5.5\%$ と、SPE投与後15℃で飼育した試験区の方が高値を示したが、有意差はみられなかった。

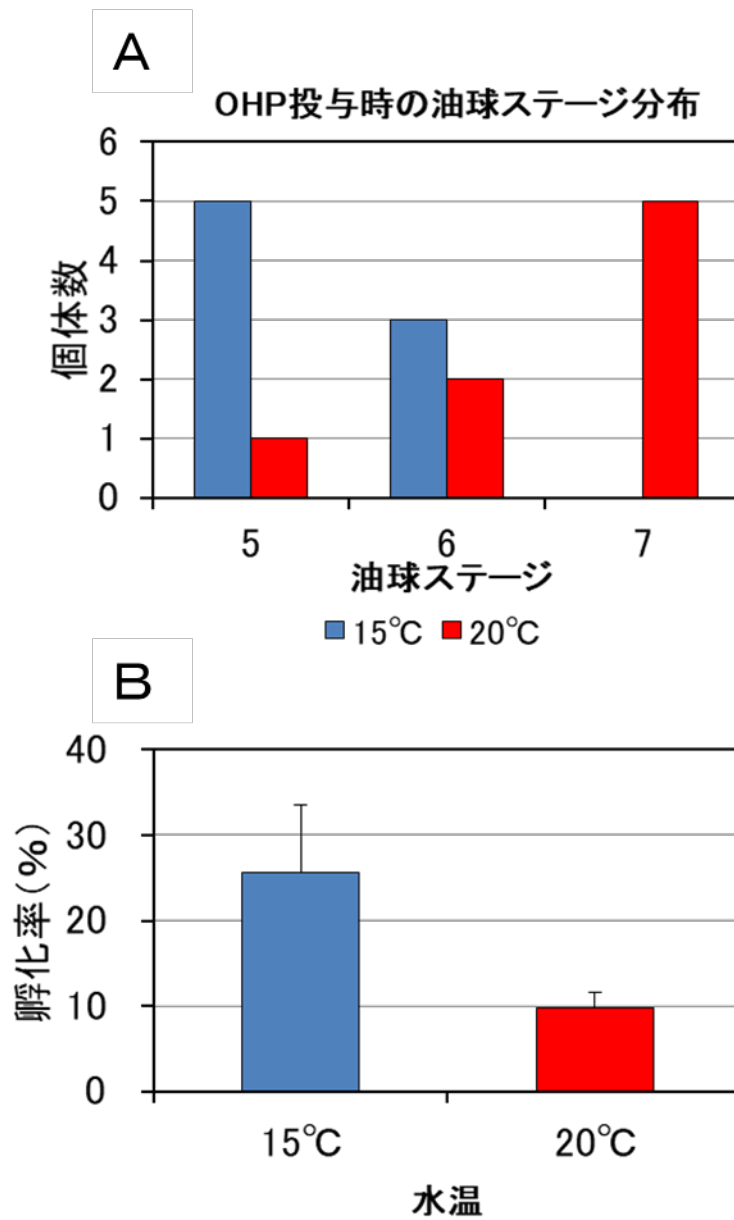


図27. 水曜日に油球ステージ5の個体について2通りの水温で24時間飼育した場合のステージ推移と孵化率



### 3. 考察

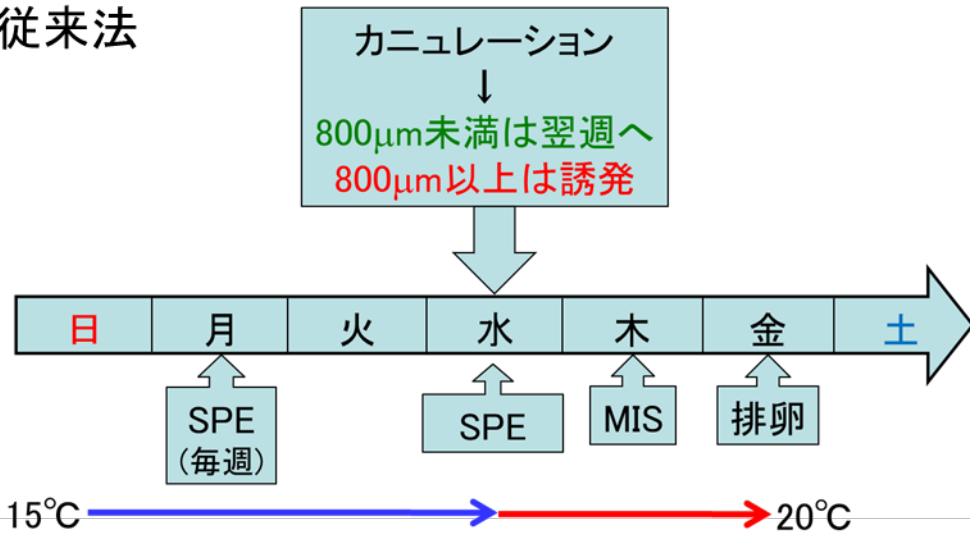
毎週月曜日に SPE の反復投与を行い，月曜日に比体重が初めて 110% を超え，水曜日に体重が催熟開始時の 120% を超えた個体の初回カニューレーション時の油球ステージは 3 が最も多く，続いて 4 であり，2 と 5 も含まれていた(図 26)。ステージ 2 だった個体を 1 週間見送っても，ステージ 3 もしくは 4 までしか進まず，同様に，ステージ 3 や 4 だった個体も大半はステージが 1 段階か 2 段階進むにとどまった(図 26)。これまでの研究で，SPE プライミングから MIS までが 24 時間で水温 20℃ の場合には，プライミングの適期はステージ 3-4 であることがわかっている。適期を過ぎてしまう，即ち過熟になることを避けるため，第 IV 章第 2 節では，月曜日にもカニューレーションを行なうことを検討したが，第 IV 章第 2 節の結果も合わせてみても，出現するステージは 2 または 3 がほとんどであり，これらの結果からは水温 15℃ で 1 週間見送っても過熟になる可能性は低いと考えられた。

ステージ 5 の個体を用いて SPE プライミング後の飼育水温を変えた実験では，両試験区とも 8 尾が排卵した。20℃ 区では木曜夕方には大半の個体が MIS 投与には遅いステージ 7 になっていたのに対し，15℃ 区ではステージの進行がかなり抑えられ(図 27A)，卵質も 20℃ 区より 15℃ 区のほうが良かった(図 27B)。このことから，SPE プライミング時にステージ 5 であっても，水温 20℃ ではなく 15℃ で飼育すれば過熟を回避して卵質を維持できることが確認された。これらのことから，あえて月曜日にカニューレーションを実施することは必要ないと考えられた。

第 IV 章第 1，2 節の成果をあわせると，油球ステージ法の作業スケジ

ュールは、**図 28B** に示すように排卵誘発の見極めを従来法(**図 28A**)の卵径から油球ステージに変更するとともに、**15℃**と**20℃**の飼育水の使い分けによって **SPE** プライミングから **MIS** 投与までの成熟を調節する方法が最善と考えられる。第IV章ではこれまで個体毎に成熟を加速・減速する方法を目指してきたが、月曜日のカニューレーションは必要無いことがわかったので、カニューレーションは水曜日のみ、飼育水温は標準(**SPE** プライミング後に **20℃**)と減速(同 **15℃**)のみである。以上で、油球ステージ法が完成したと考えられる。

### A. 従来法



### B. 油球ステージ法

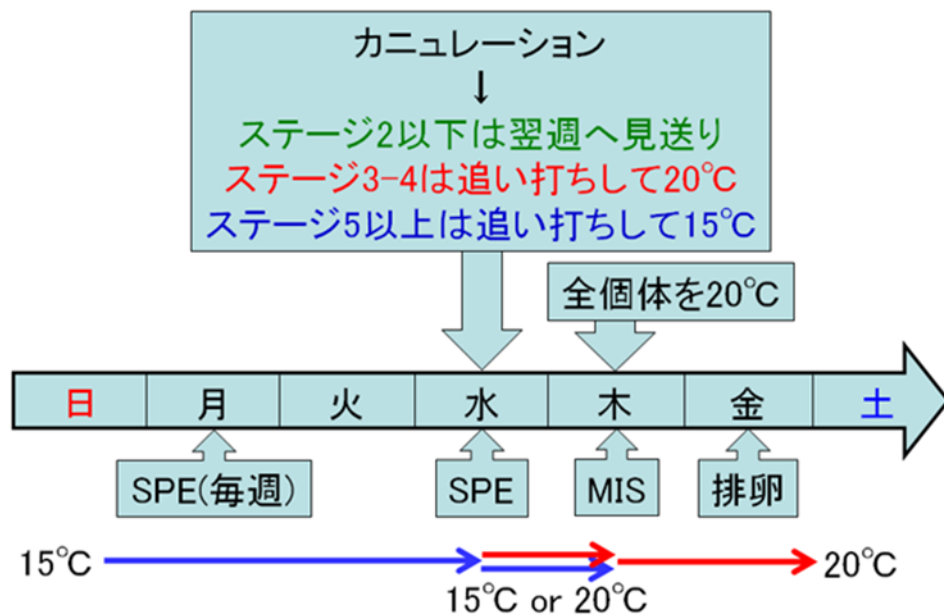


図28. 従来法から油球ステージ法への変更

## 第Ⅴ章 総合討論

本研究ではまず、第Ⅱ章において、催熟で使用する雌化ウナギは何歳が適当なのかを知るために、年級の異なる雌親魚における卵巢発達の周年変化を調べた。その結果、初回成熟（春機発動）の養成2年目の個体は秋季に卵巢が発達し、卵母細胞の油球形成は顕著に進行するが、冬季から春季にかけて油球形成後期の卵母細胞の一部は退行すると思われた。養成3年目になると、卵巢中の退行していない次群の卵母細胞の油球形成は進行するが、2回目の成熟では初回ほど発達した個体が少なくなると考えられた。このような周年変化を毎年繰り返すが、高齢になるほど油球形成後期に達する卵母細胞は少なくなる。血中11KT変化もこのことをよく裏付けていた。

以上のように、高齢になるほど秋季の卵巢発達が悪くなることが初めて明らかになり、このことが催熟結果に表れ、良質卵が得にくくなると考えられる。よって、催熟試験を行なう場合は、9月頃から行なう秋季催熟では、前年の冬～春季に購入したシラスウナギを雌化した養成2年目の親魚を用いること、4月頃から行なう春季催熟では、前々年の冬～春季に購入したシラスウナギを雌化した養成3年目の親魚を用いることが、催熟技術の高度化を目指す上で、再現性および孵化率の高い受精卵を得ることにおいても重要だと考えられる。また、長期間飼育した雌化養成親魚を用いることは、それに至るまでの餌代や、施設によっては飼育のためのボイラーを稼働させる重油代、重くなった体重に対して使用するSPEの量など、余分にかかる経費についても考えなければならない。

第Ⅱ章で得られた結果に従い、使用する雌化親魚の年齢を同じにし

ても、秋季催熟に比べると春季催熟の成績は低い傾向がみられる。その原因の一つとして、第Ⅱ章で記したように、飼育下では秋季から冬季に発達した卵母細胞が、その後の継続飼育により退行する事が一因と考えられる。そこで第Ⅲ章では、春季催熟前の冬季蓄養条件を検討し、卵母細胞の退行を防ぎ、春季催熟技術の改善を試みた。第Ⅱ章では加温飼育を行なったが、冬季に 23℃まで低下したため、秋季に卵巣が発達し春季には退行すると予想された。そこで、冬季水温を 26℃に保つことで春季の退行を防ぎ、様々な環境条件で蓄養した。その結果、催熟前には全群で卵径 200 μm 以上あり、催熟可能なサイズと確認された。第Ⅱ章の結果では、4 月頃から卵母細胞の一部が退行するようであるが、淡水高水温区でも顕著な退行は観られなかったため、少なくとも養成 2 年目の秋から 4 月までは催熟に使用できることを示すことができた。本研究では、催熟前に 15℃に水温低下と海水馴致をしているため、淡水高水温区でも孵化仔魚が得られたと思われる。各群の催熟の結果、平均孵化率は約 20-60%と多くの良質卵が得られた。採卵までの経過週数から判断すると、早期に海水馴致化した試験区が、催熟前の卵巣発達がやや進行していたようである。組織学的観察では、各群で油球形成後期から卵黄形成初期の卵母細胞を有する個体が見られたが、淡水高水温区では卵黄形成を開始している個体はいなかった。従って、卵黄形成は低水温（15℃）で 2 週間程度では開始しないと思われる。

以上のように、春季催熟前の冬期蓄養の水温低下と海水化が卵巣発達を促進することおよび冬季でも 26℃の高水温かつ淡水環境が卵巣発達を抑制することが確認された。春季催熟にもかかわらず 12 月海

水化 15°C 区の平均ふ化率は約 60%と極めて良質卵が得られる個体が多かったことは特筆すべきことである。また、低水温および海水化は卵黄形成を促進するが、日長との関係については詳細な実験はできなかった。天然の下り（銀）ウナギは秋季の低水温、短日化で多くの個体の卵巣が卵黄形成初期にまで発達する。第Ⅱ章の結果から判断すると、高水温条件でも5月から夏ころまでは卵母細胞の退行がさらに進行すると思われ、この時期の催熟と採卵は難しくなると考えられるため、今後さらに親魚の飼育環境（水温と日長）を検討する必要がある。高水温を維持することは極めて経費がかかるため、秋季の卵巣発達に及ぼす長日条件を様々な飼育水温で検討する必要があるだろう。

また、催熟前の卵巣発達の個体差が大きいことも明らかになった。このことがその後の催熟結果に影響していることはほぼ間違いないが、催熟前の卵巣発達度合を知るためには生検する必要があるが、逆に生検が大きなストレスとなり、その後の卵巣発達を抑制する可能性も考えられる。しかし、第Ⅲ章では全個体を生検しており、問題はなかった。一方、生検には手間がかかるので、催熟個体数が多い場合は省略することになるのかもしれない。

現在行われているウナギの卵を得るためのプロトコールでは、雌に毎週 SPE を注射して卵母細胞の発達を促している。卵母細胞が十分に成長した雌には、さらにプライミングのための SPE と MIS（DHP またはその前駆体の  $17\alpha$ -OHP）が投与される。これらの処理を行なわないと、卵母細胞は最終成熟と排卵に至ることは殆どなく、多くの場合さらなる SPE の注射により細胞質が変性し、排卵前（濾胞内）過熟となる。卵質が低い最も大きな原因は、これらのホルモン処理のタイミ

ングが不適切であることが挙げられる。雌の成熟の進行を評価するために、最近のウナギの催熟プロトコールでは、体重と卵母細胞径がマーカーとして使用されている。しかし、他のバイオマーカーを用いることで、排卵誘発する最適なタイミングを見つけやすくなり、結果として卵質が向上する可能性がある。その候補の一つが卵母細胞中の油球である。油球は最終成熟期に互いに融合することで急速な形態変化を示す。油球をバイオマーカーとして利用するためには、その融合の進行度合いを段階的に分類することが必要であった。そこで第IV章では、ウナギ卵母細胞における油球の形態変化を分類し、SPEとMISの連続処理による排卵誘発のタイミングを最適化するためのバイオマーカーとしての有効性を検討した。

第1節では、ウナギ卵母細胞の油球の形態変化を直径により10段階に分類し、ホルモン処理のタイミングと卵質の関係を調べることで、排卵誘導に最適な段階を明らかにした。これまで、ウナギの卵母細胞の発達におけるステージ分類は、いくつかの論文で報告されている。ニホンウナギ、ニュージーランドウナギ、ヨーロッパウナギの組織学的観察に基づいて、染色仁期から核移動期、過熟期までの幅広い卵母細胞の発達段階が分類された。卵母細胞の最終成熟については、Pedersen (2003) と Palstra ら (2005) がヨーロッパウナギについて、油球の出現、卵母細胞径および核移動に基づいて、それぞれ4段階と7段階に分類している。しかし、これまでの研究では、排卵誘導ホルモンを投与した段階とその後の排卵および卵質との関係は十分に解明されておらず、その主な理由は、良質の卵を得た雌の事例数が不十分であったためである。

現在行われている雌ウナギの催熟の方法を用いると、極めて質の高い卵（孵化率 80%以上）は、まれにしか得られない。卵質は排卵誘発のタイミングだけに依存するわけではないが、ホルモン処理のタイミングを含め、卵質に必要な条件をすべて満たした場合にのみ、このような質の高い卵が得られると考えられる。したがって、そのように高い質の卵が得られた雌に SPE や MIS を投与したタイミングを調べることで、最適な処理のタイミングを明らかにすることができる。その結果、養成雌化ウナギについて高い卵質の卵が得られた雌の多くは、ステージ 3 または 4 で SPE をプライミングし、ステージ 6 で 17 $\alpha$ -OHP を投与し、その結果ステージ 7 で排卵したことがわかった。また、成熟の進行を正確に評価するためには、卵母細胞径や比体重よりも油球ステージの方がより感度の高いバイオマーカーとなり得ると考えられた。油球ステージをバイオマーカーとして使用することで、ニホンウナギにおいて質の高い卵の生産性が向上することが示唆された。

それでは、そのような条件の油球ステージにどうやって誘導するかが問題となる。卵母細胞の最終成熟と排卵は、温度に影響されることが示されている（Kagawa, 2006）。したがって、油球ステージは飼育水温の影響を受けて進行することが予想される。SPE によるプライミングから排卵まで水温を 20°C に保ち、第 1 節の結果のように、SPE のプライミングと MIS の投与間隔が 24 時間程度であれば、プライミングはステージ 3~4、MIS 投与はステージ 6、排卵（人工授精）はステージ 7 が最適タイミングとなる。飼育水温操作によって、これらのステージで全ての雌を処理できるように技術を向上させれば、不適切な処理タイミングによる卵質低下を最小限に抑え、質の高い卵を得る機



会を増やすことができると考えられる。そこで第2節では、それぞれの処理に最適な油球ステージに誘導するための方法を検討した。もちろん、催熟期間中、毎日24時間雌の最終成熟の進行をモニター出来ればそのような技術は不要であるが、種苗生産試験中に毎日実施することは非現実的であり、現在のプロトコールで実施されてきたように、予定された曜日と時間にMISを投与することが現実的である。その第一歩として、第2節では、MIS投与前の3日間の飼育水温操作が、卵母細胞の成熟進行に及ぼす影響を検討した。通常、雌ウナギの催熟には、低温（15℃）と高温（20℃）での飼育が行われている。卵母細胞の成熟の進行制御をこの2種類の飼育水を用いて行なうことは、現状の施設でも可能であり、好都合である。そこで、雌ウナギ親魚の飼育に水温15℃と20℃の海水を用い、卵母細胞の成熟進行の加速と減速を検討した。その結果、15℃と20℃で飼育することで、各雌の卵母細胞の成熟の進行を加速または減速できることが明らかになった。

次の検討項目として、全ての雌に最適なステージでMISを投与するために、各雌の卵母細胞の成熟の進行を制御する方法を開発する必要がある。水温15℃と20℃での雌親魚の適切な飼育方法を決定する必要がある。飼育水温15℃と20℃の切り替えのタイミングを変更すれば、ほとんどの雌を予定日時にMIS（またはその前駆体）の投与に最適なステージ（ステージ6）にすることが可能かもしれない。一方、月曜日に行なう第1回目の油球ステージ判定では、そのほとんどが油球ステージ2であることが分かった。以上のことから、第3節では、一定条件下における第1回目の油球ステージ出現頻度の測定や、油球ステージ別の1週間後のステージ推移を測定することにより、より簡単

な油球ステージ誘導法を見出し、油球ステージ法の完成を目指した。毎週月曜日に SPE の反復投与を行い、月曜日に比体重が初めて 110% を超え、水曜日に体重が催熟開始時の 120% を超えた個体の初回カニュレーション時の油球ステージは 3 が最も多く、続いて 4 であり、2 と 5 も含まれていた。第 2 節での結果では、油球ステージは 2 が最も多かったが、これは月曜日時点での結果であり、条件が異なる。しかし、比体重 110% を一つの目安としておけば、最適期を過ぎた個体ばかりが出現することは無いと思われる。ステージ 2 だった個体を 1 週間見送っても、ステージ 3 もしくは 4 までしか進まず、同様に、ステージ 3 や 4 だった個体も大半はステージが 1 段階か 2 段階進むにとどまった。これまでの研究で、SPE プライミングから MIS までが 24 時間で水温 20°C の場合には、プライミングの適期はステージ 3-4 であることがわかっている。適期を過ぎてしまうと、即ち過熟になることを避けるため、第 IV 章第 2 節では、月曜日にもカニュレーションを行なうことを検討したが、第 IV 章第 2 節の結果も合わせてみても、出現するステージは 2 または 3 がほとんどであり、これらの結果からは水温 15°C で 1 週間見送っても過熟になる可能性は低いと考えられた。ステージ 5 の個体を用いて SPE プライミング後の飼育水温を変えた実験では、20°C 区では木曜夕方には大半の個体が MIS 投与には遅いステージ 7 になっていたのに対し、15°C 区ではステージの進行がかなり抑えられ、卵質も 20°C 区より 15°C 区のほうが良かった。このことから、SPE プライミング時にステージ 5 であっても、水温 20°C ではなく 15°C で飼育すれば過熟を回避して卵質を維持できることが確認された。これらのことから、あえて月曜日にカニュレーションを実施することは

必要ないと考えられた。

以上のように、第IV章第1, 2節の成果をあわせると、油球ステージ法の作業スケジュールは、排卵誘発の見極めを従来法の卵径から油球ステージに変更するとともに、15℃と20℃の飼育水の使い分けによってSPEプライミングからMIS投与までの成熟を調節する方法が最善と考えられる。第IV章ではこれまで個体毎に成熟を加速・減速する方法を目指してきたが、月曜日のカニューレーションは必要無いことがわかったので、カニューレーションは水曜日のみ、飼育水温は標準(SPEプライミング後に20℃)と減速(同15℃)のみである。以上で、油球ステージ法が完成したと言える。

しかし、ウナギの卵質は、先述のように、様々な要因に依存しており、例えば、養成中の親魚の栄養状態は、卵中の生化学的組成に影響を与え、孵化率や仔魚の生残率に影響を与える。さらに、ウナギの卵は排卵後急速に過熟になるため、排卵から人工授精までの時間が受精率や孵化率に強く影響する。しかし、人工授精ではなく雄との産卵行動により受精卵を得ている研究機関もあり、この場合は排卵後過熟を気にする必要はないかもしれない。むしろ、大量種苗生産をする場合には、人工授精作業が不要になるため省力化できる。

したがって、卵質は排卵を誘発するタイミングに完全に依存するわけではないが、卵質にとって重要な要因の一つであることは確かである。第IV章から、推定される最適な時期に排卵させた雌でも低い質の卵が観察されることがあり、排卵誘発のタイミングは必要条件ではあるが、十分条件ではない。良質な卵を得るためには、上述の要因も考慮する必要があるだろう。加えて、本研究で提案した方法も多少の熟練が

必要であり，作業する人によっては，安定して良質卵を生産できない場合もある。

現在の催熟方法では，卵黄形成および最終成熟のためのプライミングに SPE を使用する。しかし，近年ウナギ属魚種の組換え生殖腺刺激ホルモンが様々な方法を用いて合成されてきた。先述のように，ニホンウナギの組換え濾胞刺激ホルモン(FSH)や黄体形成ホルモン (LH) が商業生産される様になり，従来の SPE や hCG 投与よりも卵形成や精子形成の誘導に有効であることが示されている(Ohta et al., 2017; Kazeto and Tanaka 2020)。催熟実験で使用する雌化ウナギの年齢は本研究で得られた知見を適用するのが良いと思われるが，最近では，催熟プロトコールで SPE を組換え生殖腺刺激ホルモンに置き換え，FSH や LH の適時処理や，卵母細胞の成熟進行に及ぼす温度の影響も再検討され，本研究で得られた知見をもとに，組換え生殖腺刺激ホルモン用に再構築されつつある。

天然ウナギの卵巣中の卵母細胞は二つのサイズが異なる卵群が揃って存在しているのに対して，SPE による催熟魚では多くの卵群がある。SPE には LH が多く含まれ，卵群が不揃いになる原因と予想される。これに対して FSH 処理は卵群が不揃いになることはなく，SPE 処理より優れている。しかし，組換え生殖腺刺激ホルモンは SPE より高価であるため，本研究で得られた成果を適用した効果的な使用が望まれる。

以上本研究の結果から，催熟試験に使用する雌化親魚は，秋季催熟ではシラスウナギから養成 2 年目の雌化親魚を，春季催熟では養成 3 年目の雌化親魚を用い，冬季蓄養条件も考慮に入れ催熟を行なうこと

で高い確率で良質卵が得られることを示した。催熟試験は再現性が低いと関係者の間で行われることが多いが、これは経験不足による採卵時のハンドリングや、用いる雌化養成親魚の年齢の違いなどが影響するためだと考えられる。親魚として、余った高齢魚を使用することは、全く異なる条件の個体を供試魚として用いることになるのである。また、油球ステージ法の導入は、カニューレーション後、卵径を測定することなく、その場で検鏡すればステージ判定でき、作業が効率化することも提案できた。これらの知見は、ニホンウナギの孵化率向上に必ず貢献できるであろう。本研究成果により、ニホンウナギの人工種苗生産技術開発における重要課題の一つである卵質改善については、卵質悪化の分子機構解析は残されているものの、技術面ではほぼ解決されたと言え、他の重要課題である仔魚に与える飼料や飼育設備の改善および総合的なシラスウナギ生産コスト削減が研究の中心となっていくであろう。

## 第VI章 要約

本研究では、雌化養成ニホンウナギを用いた催熟技術の高度化を目指し、年級の異なる雌化ウナギにおける卵巢発達の周年変化、春季催熟における成績向上のための冬季蓄養条件の検討、最適な時期に排卵誘発するための新たなバイオマーカーとして、油球の融合状態を指標化する検討を行なった。そして、そのステージ制定、孵化率が高いときの SPE プライミング時、MIS（またはその前駆体）投与時、人工授精時の油球ステージを調べた。また、15℃と20℃の飼育水温を用いてその最適期に誘導する方法について検討した。以下に、本研究で得られた知見をまとめる。

### (1) 年級の異なる雌化ウナギにおける卵巢発達の周年変化

催熟で使用する雌化ウナギは何歳が適当なのかを調べるため、養成2年目（平均体重±標準誤差（以下、同じ）：553.1g±166.3 g）、3年目（920.4g±202.1 g）、6年目（1,216.6±118.1 g）の雌化養成ウナギを用い、淡水、自然日長下のハウス内で淡水高温（水温23～28℃）飼育し、おおよそ月に1回、各年級群7～9尾飼育水槽から任意に抽出し、卵巢発達の周年変化を調べた。

その結果、養成2年目の雌化ウナギの卵径およびGSIは、5月には他の年級群と比べて有意に低値を示したが、11月以降は、他の年級群に比べ高値を示した。卵巢中の卵母細胞のステージは5月には油球形成後期の卵母細胞は観られなかったが、10月以降は油球形成後期の卵母細胞が多く、卵黄形成初期に達したものもあった。しかし、養成3年目の5月になると、油球形成後期の卵母細胞は多くが退行した。退

行しなかった次群の卵母細胞は再び油球形成が進行したが、2年目ほど発達したものは多くはなかった。養成6年目になると、卵径およびGSIは、常に他の年級より低値を示し、油球形成後期に達する卵母細胞はほとんど観られなかった。これらの変化に伴い血中11KT量は養成2年目と3年目は春季から秋季に向けて上昇し、特に養成2年目の値の上昇は顕著で、他の年級群と比べて有意に高値を示した。一方、養成6年目の値は多くが他の年級群より低値を示した。

以上のように、高齢になるほど秋季の卵巢発達が悪くなることが初めて明らかになり、このことが催熟結果に表れ、良質卵が得にくくなると考えられた。また、生検により個体を殺すことなく取り出した卵巢卵の卵径や血中11KT量が良質親魚を識別するよい指標となることも確認された。しかし、いずれの年級群においても卵巢発達の個体差は大きく、若齢魚でも催熟成績が悪かったり、高齢魚でも良質卵が得られたりすることも珍しくはないことから、催熟前の卵巢発達度を事前に把握しておくことにより、良質卵を多く得ること考えられた。

## (2) 春季催熟技術の改善

秋季から冬季に行なう催熟結果に比べて、春季に行なう催熟成績は低い傾向がみられる。その原因の一つとして、第II章で記したように、飼育下では秋季から冬季に発達した卵母細胞が、その後の継続飼育により退行するためと思われる。1年中、良質卵を得るためには、春季催熟結果の向上が不可欠であり、そのためには、卵母細胞の退行をなるべく防ぐ技術が必要不可欠である。そこで本章では、春季催熟前の冬季蓄養条件を検討し、卵母細胞の退行を防ぎ、春季催熟技術の改善を

試みた。

実験には養成2年目の雌化養成ウナギを用いた。12月1日までは水温26~28℃、自然日長で淡水給餌飼育した。12月1日からは12月海水化自然水温区、12月海水化15℃区、2月海水化15℃区、淡水高水温区（給餌あり）の計4群を設けた。これらの条件で蓄養した結果、催熟前には全群で卵径200 μm以上あり、催熟可能なサイズと確認された。II章の結果では、4月頃から卵母細胞の一部が退行するようであるが、淡水高水温区でも顕著な退行は観られなかったため、少なくとも養成2年目の秋から4月までは催熟に使用できると考えられた。

各群の催熟の結果、平均孵化率は約20-60%と多くの良質卵が得られた。採卵までの経過週数から判断すると、12月海水化自然水温区と12月海水化15℃区における催熟前の卵巣発達がやや進行していたようである。組織学的観察では、各群で油球形成後期から卵黄形成初期の卵母細胞を有する個体がみられたが、淡水高水温区では卵黄形成を開始している個体はいなかった。従って、卵黄形成は低水温（15℃）で2週間程度では開始しないと考えられた。

以上のように、春季催熟前の冬期蓄養の水温低下と海水化が卵巣発達を促進することおよび高水温かつ淡水環境が卵巣発達を抑制することが確認された。12月海水化15℃区の平均ふ化率は約60%と極めて良質卵が得られる個体が多かった。一方、12月海水化自然水温区は有意にふ化率が低かったが、催熟前の水温が15℃区より低かったことが原因と考えられた。また、催熟前の卵巣発達の個体差が大きいことも明らかになった。II章の結果から判断すると、高水温条件でも5月から夏ころまでは卵母細胞の退行がさらに進行すると思われ、この時期



の催熟と採卵は難しくなると考えられるため、今後親魚の飼育環境（水温と日長）を工夫する必要があると考えられた。

### (3)油球ステージ法の確立による催熟技術の高度化

現在、ウナギの卵を得るためのプロトコールでは、雌に毎週 SPE を注射して卵母細胞の発達を促している。卵母細胞が十分に成長した成熟雌は、最終成熟とそれに続く排卵を誘導するために、プライミングのための SPE と卵成熟誘起ステロイド (MIS) またはその前駆体を投与する。これらの処理を行わないと、卵母細胞は最終成熟と排卵に至ることは殆どなく、多くの場合さらなる SPE の注射より細胞質が変性し、過熟となる。卵質が低い最も大きな原因は、これらのホルモン処理のタイミングが不適切であることが挙げられる。雌の成熟の進行を評価するために、最近のウナギの催熟プロトコールでは、比体重と卵母細胞径がマーカーとして使用されている。しかし、他のバイオマーカーを用いることで、排卵誘発する最適なタイミングを見つけやすくなり、結果として卵質が向上する可能性がある。その候補の一つが卵母細胞中の油球である。油球は最終成熟期に互いに融合することで急速な形態変化を示す。油球をバイオマーカーとして利用するためには、その融合の進行度合いを段階的に分類することが必要である。そこで第IV章では、ウナギ卵母細胞における油球の形態変化を分類し、SPE と MIS の連続処理による排卵誘発のタイミングを最適化するためのバイオマーカーとしての有効性を検討した。

第 1 節では、ウナギ卵母細胞の油球の形態変化を直径により 10 段階に分類し、ホルモン処理のタイミングと卵質の関係を調べることに

より、排卵誘導に最適な段階を明らかにした。その結果、高い卵質の卵が得られた雌の多くは、ステージ 3~4 で SPE をプライミングし、ステージ 6 で  $17\alpha$ -OHP を投与し、その結果ステージ 7 で排卵したことがわかった。また、卵母細胞径や比体重よりも油球ステージの方がより感度の高いバイオマーカーとなり得ることが示され、ニホンウナギにおいて質の高い卵の生産性が向上することが示唆された。

第 2 節では、各雌を 15°C または 20°C で飼育することにより、卵母細胞の成熟の進行の偏りを是正し、卵母細胞の成熟の進行を加速または減速させることができた。週 1 回の SPE 注射と排卵誘発に必要な低温 (15°C) と高温 (20°C) でそれぞれ飼育すれば、新たな温度帯の水槽を用意する必要はない。低温飼育と高温飼育の適切な切り替え時期を決定した上で、ほとんどの雌を MIS 投与に最適な成熟期 (ステージ 6) に誘導することが可能と考えられた。

第 3 節では、毎週月曜日に SPE の反復投与を行い、月曜日に比体重が初めて 110% を超え、水曜日に体重が催熟開始時の 120% を超えた個体の初回カニキュレーション時の油球ステージを調べた。その結果、ステージ 3 が最も多く、続いて 4 であり、2 と 5 も含まれていた。ステージ 2 だった個体を 1 週間見送っても、ステージ 3 もしくは 4 までしか進まず、同様に、ステージ 3 や 4 だった個体も大半はステージが 1 段階か 2 段階進むにとどまった。第 IV 章第 2 節では、月曜日にもカニキュレーションを行なうことを検討したが、第 IV 章第 2 節の結果も合わせてみても、出現するステージは 2 または 3 がほとんどであり、これらの結果からは水温 15°C で 1 週間見送っても過熟になる可能性は低いと考えられた。

ステージ 5 の個体を用いて SPE プライミング後の飼育水温を変えた実験では、20℃区では木曜夕方には大半の個体が MIS 投与には遅いステージ 7 になっていたのに対し、15℃区ではステージの進行がかなり抑えられ、卵質も 20℃区より 15℃区のほうが良かった。このことから、SPE プライミング時にステージ 5 であっても、水温 20℃ではなく 15℃で飼育すれば過熟を回避して卵質を維持できることが確認された。これらのことから、あえて月曜日にカニューレーションを実施することは必要ないと考えられた。以上のことから、油球ステージ法の作業スケジュールは、排卵誘発の見極めを従来法の卵径から油球ステージに変更するとともに、15℃と 20℃の飼育水の使い分けによって SPE プライミングから MIS 投与までの成熟を調節する方法が最善と考えられる。カニューレーションは従来どおり水曜日のみで、飼育水温は標準 (SPE プライミング後に 20℃) と減速 (同 15℃) のみで良いことが分かり、油球ステージ法が完成したと考えられた。

## 第Ⅶ章 参考文献

Arai, T. (2014) Do we protect freshwater eels or do we drive them to extinction? SpringerPlus 3: 534

Brooks, S., Tyler C.R. and Sumpter, J.P. (1997) Egg quality in fish: what makes a good egg? Rev. Fish Biol. Fish. 7, 387-416.

Chai, Y., Tosaka, R., Abe, T., Sago, K., Sago, Y., Hatanaka, E., Ijiri, S. and Adachi, S. (2010) The relationship between the developmental stage of oocytes in various seasons and the quality of the egg obtained by artificial maturation in the feminized Japanese eel *Anguilla japonica*. Aquacult Sci 58: 269–278

Damsteegt, E.L., Thomson-Laing, G., Wylie, M.J. and Lokman, P.M. (2020) Effects of estradiol and 11-ketotestosterone pre-treatment on artificial induction of maturation in silver female shortfinned eels (*Anguilla australis*). PLoS ONE 15: e0229391

Di Biase, A., Lokman, P.M., Govoni, N., Casalini, A., Emmanuele, P., Parmeggiani, A. and Mordenti, O. (2017) Co-treatment with androgens during artificial induction of maturation in female eel, *Anguilla anguilla*: effects on egg production and early development. Aquaculture 479: 508–515

Endo, T., Todo, T., Lokman, PM., Kudo, H., Ijiri, S., Adachi, S. and Yamauchi, K. (2011) Androgens and very low density lipoprotein are essential for the growth of previtellogenic oocytes from Japanese eel, *Anguilla japonica*, in vitro Biol. Reprod., 84, 816-825.

Furuita, H., Hori, K., Suzuki, T., Sugita, T. and Yamamoto, T. (2007) Effect of n-3 and n-6 fatty acids in broodstock diet on reproduction and fatty acid composition of broodstock and eggs in the Japanese eel *Anguilla japonica*. Aquaculture 267, 55-61.

Furuita, H., Ohta, H., Unuma, T., Tanaka, H., Kagawa, H., Suzuki, N. and Yamamoto, T. (2003) Biochemical composition of eggs in relation to egg quality in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Fish Physiol. Biochem. 29, 37-46.

Furuita, H., Unuma, T., Nomura, K., Tanaka, H., Okuzawa, K., Sugita, T. and Yamamoto, T. (2006) Lipid and fatty acid composition of eggs producing larvae with high survival rate in the Japanese eel. J. Fish Biol. 69, 1178-1189.

Furuita, H., Unuma, T., Nomura, K., Tanaka, H., Sugita, T. and Yamamoto, T. (2009) Vitamin contents of eggs that produce larvae showing a high survival rate in the Japanese eel *Anguilla japonica*. Aquacul. Res. 40, 1270-1278.

日比谷京 (1961) ウナギの完熟採卵に成功. 養殖, 3, 12-15.

Horie, N., Utoh, T., Mikawa, N., Yamada, Y., Okamura, A., Tanaka, S. and Tsukamoto, K. (2008) Influence of artificial fertilization methods of the hormone-treated Japanese eel *Anguilla japonica* upon the quality of eggs and larvae (comparison between stripping-insemination and spontaneous spawning methods). Nippon Suisan Gakkaishi 74, 26-35. (in Japanese with English abstract)

Ijiri, S., Kayaba, T., Takeda, N., Tachiki, H., Adachi, S. and Yamauchi, K. (1998) Pretreatment reproductive stage and oocyte development induced by salmon pituitary homogenate in the Japanese eel *Anguilla japonica*. Fish. Sci., 64, 531-537.

Ijiri, S., Tsukamoto, K., Chow, S., Kurogi, H., Adachi, S. and Tanka, H. (2011) Controlled reproduction in Japanese eel (*Anguilla japonica*) past and present. Aquaculture Euro., 36, 13-17.

石田修, 石井俊雄 (1970) ウナギの成熟促進試験. 水産増殖, 17, 263-271. of rearing period in seawater on induced maturation in female Japanese eel *Anguilla japonica*. Fish. Sci., 64, 77-82.

Kagawa, H., Iinuma, N., Tanaka, H., Ohta, H. and Okuzawa, K.

(1998) Effects of rearing period in seawater on induced maturation in female Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish Sci* 64: 77–82

Kagawa, H., Sakurai, Y., Horiuchi, R., Kazeto, Y., Gen, K., Imaizumi, H. and Masuda, Y. (2013) Mechanism of oocyte maturation and ovulation, and its application to seed production in the Japanese eel. *Fish Physiol Biochem* 39:13–17

Kagawa, H., Tanaka, H., Ohta, H., Okuzawa, K. and Iinuma, N. (1997) Induced ovulation by injection of 17,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the artificially matured Japanese eel, with special reference to ovulation time. *Fish Sci* 63: 365–367

Kagawa, H., Tanaka, H., Ohta, H., Unuma, T. and Nomura, K. (2005) The first success of glass eel production in the world: basic biology on fish reproduction advances new applied technology in aquaculture. *Fish Physiol Biochem* 31: 193–199

Kagawa, H. (2003) Artificial induction of oocyte maturation and ovulation. In: Aida, K., Tsukamoto, K. and Yamauchi, K. (Eds.), *Eel biology*. Springer-Verlag, Tokyo, 401-414.

Kagawa, H. (2006) Studies on factors affected in induced oocyte maturation, ovulation and egg quality in Japanese eel. *Bull. Fish.*

Res. Agen. Suppl. 5, 39-44. (in Japanese with English abstract)

Kagawa, H., Iinuma, N., Tanaka, H., Ohta, H. and Okuzawa, K. (1998) Effects of rearing period in seawater on induced maturation in female Japanese eel *Anguilla japonica*. Fish. Sci. 64, 77-82.

Kagawa, H., Ohta, H. and Tanaka, H. (2001) Recent progress of research on larvae production of Japanese eel, *Anguilla japonica*. Suisanzoshoku 49, 127-132.

Kagawa, H., Tanaka, H., Ohta, H., Okuzawa, K. and Hirose, K. (1995) In vitro effects of  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone and  $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one on final maturation of oocytes at various developmental stages in artificially matured Japanese eel *Anguilla japonica*. Fish. Sci. 61, 1012-1015.

Kagawa, H., Tanaka, H., Ohta, H., Okuzawa, K. and Iinuma, N. (1997) Induced ovulation by injection of  $17,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the artificially matured Japanese eel, with special reference to ovulation time. Fish. Sci. 63, 365-367.

Kagawa, H., Tanaka, H., Ohta, H., Unuma T. and Nomura K. (2005) The first success of glass eel production in the world: basic biology on fish reproduction advances new applied technology in



aquaculture. *Fish Physiol. Biochem.* 31, 193-199.

Kaifu, K. and Yokouchi, K. (2019) Increasing or decreasing? - Current status of the Japanese eel stock. *Fish Res* 220: 105348

Kamei, H., Ohira, T., Yoshiura, Y., Uchida, N., Nagasawa, H. and Aida, K. (2003) Expression of a biologically active recombinant follicle stimulating hormone of Japanese eel *Anguilla japonica* using methylotropic yeast. *Gen Comp Endocrinol* 134: 244–254

Kazeto, Y., Kohara, M., Miura, T., Miura, C., Yamaguchi, S., Trant, J.M., Adachi, S. and Yamauchi, K. (2008) Japanese eel follicle-stimulating hormone (Fsh) and luteinizing hormone (Lh): production of biologically active recombinant Fsh and Lh by *Drosophila* S2 cells and their differential actions on the reproductive biology. *Biol Reprod* 79: 938–946

Kazeto, Y. and Tanaka, T. (2020) Study on artificial induction of maturation and ovulation in Japanese eel using the recombinant gonadotropins: application to the seed production. *Nippon Suisan Gakkaishi* 86; 364–366 (in Japanese)

Kazeto, Y., Tanaka, T., Suzuki, H., Ozaki, Y., Fukada, H. and Gen, K. (2019) Development and validation of enzyme-linked

immunosorbent assays specific for follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in Japanese eel. *Fish Sci* 85: 829–837

Kjørsvik, E., Mangor-Jensen, A. and Holmefjord, I. (1990) Egg quality in fishes. *Adv Mar Biol* 26: 71–113

Kjørsvik, E., Mangor-Jensen, A. and Holmefjord, I. (1990) Egg quality in fishes. *Advances in Marine Biology* 26, 71-113.

Kobayashi, M., Hayakawa, Y., Park, W., Banba, A., Yoshizaki, G., Kumamaru, K., Kagawa, H., Kaki, H., Nagaya, H. and Sohn, Y.C. (2010) Production of recombinant Japanese eel gonadotropins by baculovirus in silkworm larvae. *Gen Comp Endocrinol* 167: 379–386

小林牧人，足立伸次（2002）生殖．魚類生理学の基礎，会田勝美，恒星社恒星閣，東京，155-184.

小林牧人，大久保範聡，足立伸次（2013）生殖．増補改訂版魚類生理学の基礎，会田勝美，恒星社恒星閣，東京，149-183.

Kottmann, J.S., Jørgensen, M.G.P., Bertolini, F., Loh, A. and Tomkiewicz, J. (2020) Differential impacts of carp and salmon pituitary extracts on induced oogenesis, egg quality, molecular

ontogeny and embryonic developmental competence in European eel.  
PLoS ONE 15: e0235617

Lokman, P.M., Wylie, M.J., Downes, M., Di Biase, A. and Damsteegt, E.L. (2015) Artificial induction of maturation in female silver eels, *Anguilla australis*: The benefits of androgen pre-treatment. *Aquaculture* 437: 111–119

Lokman, P.M. and Young, G. (2000) Induced spawning and early ontogeny of New Zealand freshwater eels (*Anguilla dieffenbachii* and *A. australis*). *NZJ Mar Freshwat Res* 34: 135–145

Lokman, P.M. and Young, G. (1998) An intersexual migratory (silver) longfinned New Zealand eel (*Anguilla dieffenbachii*) and its gonadal response to treatment with salmon pituitary homogenate. *J. Fish Biol.* 52, 547-555.

Masuda, Y., Imaizumi, H., Oda, K., Hashimoto, H., Usuki, H. and Teruya, K. (2012) Artificial completion of the Japanese eel, *Anguilla japonica*, life cycle: challenge to mass production. *Bull Fish Res Agency* 35: 111–117

松井魁 (1972) 内部形態とその構造. 鰻学 (生物学的研究篇), 恒星社厚生閣, 148-184.

Müller, T., Váradi, B., Horn, P. and Bercsényi, M. (2003) Effects of various hormones on the sexual maturity of European eel (*Anguilla anguilla* L.) females from farm and lakes. Acta Biol Hung 54: 313–322

Müller, T., Váradi, B., Horn, P. and Bercsényi, M. (2003) Effects of various hormones on the sexual maturity of European eel (*Anguilla anguilla* L.) females from farm and lakes. Acta Biol. Hungarica 54, 313-322.

Nagahama, Y. and Adachi, S. (1985) Identification of a maturation-inducing steroid in a teleost, the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). Dev. Biol., 109, 428-435.

Ohta, H. and Izawa, T. (1996) Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. Aquaculture 142: 107–118

Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K. and Hirose, K. (1996) Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by 17,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquaculture 139: 291–301

Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K., Iinuma, N. and Hirose, K. (1997) Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Fish Physiol Biochem 17: 163–169

Ohta, H., Sato, Y., Imaizumi, H. and Kazeto, Y. (2017) Changes in milt volume and sperm quality with time after an injection of recombinant Japanese eel luteinizing hormone in male Japanese eels. Aquaculture 479: 150–154

Ohta, H. and Izawa, T. (1996) Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. Aquaculture 142, 107-118.

Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K. and Hirose, K., (1996) Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by 17,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Aquaculture 139: 291-301.

Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K., Iinuma, N. and Hirose, K. (1997) Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Fish Physiol. Biochem. 17, 163-169.

Okamura, A., Yamada, Y., Horie, N., Utoh, T., Mikawa, N., Tanaka, S. and Tsukamoto, K. (2008) Effects of silvering state on induced maturation and spawning in wild female Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish Sci* 74: 642–648

Okamura, A., Yamada, Y., Mikawa, N., Horie, N., Utoh, T., Kaneko, T., Tanaka, S. and Tsukamoto, K. (2009) Growth and survival of eel leptocephali (*Anguilla japonica*) in low-salinity water. *Aquaculture* 296, 367-372.

Oliveira, K. and Hable, W.E. (2010) Artificial maturation, fertilization, and early development of the American eel (*Anguilla rostrata*). *Can J Zool* 88: 1121–1128

Palstra, A.P., Cohen, E.G.H., Niemantsverdriet, P.R.W., van Ginneken, V.J.T. and van den Thillart, G.E.E.J.M. (2005) Artificial maturation and reproduction of European silver eel: development of oocytes during final maturation. *Aquaculture* 249: 533–547

Palstra, A.P., Cohen, E.G.H., Niemantsverdriet, P.R.W., van Ginneken, V.J.T. and van den Thillart, G.E.E.J.M. (2005) Artificial maturation and reproduction of European silver eel: development of oocytes during final maturation. *Aquaculture* 249, 533–547.

Pedersen, B.H. (2004) Fertilisation of eggs, rate of embryonic development and hatching following induced maturation of the European eel *Anguilla anguilla*. *Aquaculture* 237: 461–473

Pedersen, B.H. (2003) Induced sexual maturation of the European eel *Anguilla anguilla* and fertilisation of the eggs. *Aquaculture* 224, 323-338.

Peñaranda, D.S., Gallego, V., Rozenfeld, C., Herranz-Jusdado, J.G., Pérez, L., Gómez, A., Giménez, I. and Asturiano, J.F. (2018) Using specific recombinant gonadotropins to induce spermatogenesis and spermiation in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Theriogenology* 107: 6–2

Sato, N., Kawazoe, I., Suzuki, Y. and Aida, K. (2006) Effects of temperature on vitellogenesis in Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish. Sci.* 72, 961-966.

Satoh, H., Yamamori, K. and Hibiya, T. (1992) Induced spawning of the Japanese eel. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58, 825-832.

Seoka, M., Yamada, S., Iwata, Y., Yanagisawa, T., Nakagawa, T. and Kumai, H. (2003) Differences in the biochemical content of buoyant and non-buoyant eggs of the Japanese eel, *Anguilla japonica*.

Aquaculture 216, 355-362.

da Silva, F.F.G., Jacobsen, C., Kjørsvik, E., Støttrup, J.G. and Tomkiewicz, J. (2018) Oocyte and egg quality indicators in European eel: Lipid droplet coalescence and fatty acid composition. Aquaculture 496: 30–38

Sugimoto, Y., Takeuchi, Y., Yamauchi, K. and Takahashi, H. (1976) Induced maturation of female Japanese eels (*Anguilla japonica*) by administration of salmon pituitaries, with notes on changes of oil droplets in eggs of matured eels. Bull. Fac. Fish. Sci. Hokkaido Univ. 27, 107-120. (in Japanese with English abstract)

水産庁 (2015) ウナギをめぐる状況と対策について (平成 27 年 11 月). 農林水産省.

立木宏幸 (1992) ウナギ種苗生産研究の現状. 養殖, 29, 94-96.

Tachiki, H. and Nakagawa, T. (1993) Induction of spawning in female cultured eel *Anguilla japonica*. Bull. Aichi Fish. Res. Inst. 1, 79-80. (in Japanese)

Tachiki, H., Nakagawa, T., Tamura, K. and Hirose, K. (1997) Effects of oral administration of estradiol-17 $\beta$  to young on gonadal sex and



growth of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Suisanzousyoku*, 45, 61-66. (In Japanese)

Tanaka, H. (2015) Progression in artificial seedling production of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish Sci* 81: 11–19

Tanaka, H., Kagawa, H. and Ohta, H. (2001) Production of leptocephali of Japanese eel (*Anguilla japonica*) in captivity. *Aquaculture* 201: 51–60

Tanaka, H., Kagawa, H., Ohta, H., Unuma, T. and Nomura, K. (2003) The first production of glass eel in captivity: fish reproductive physiology facilitates great progress in aquaculture. *Fish Physiol Biochem* 28: 493–497

Tanaka, H., Kagawa, H. and Ohta, H. (2001) Production of leptocephali of Japanese eel (*Anguilla japonica*) in captivity. *Aquaculture* 201, 51-60.

Tanaka, H., Kagawa, H., Ohta, H., Unuma, T. and Nomura, K. (2003) The first production of glass eel in captivity: fish reproductive physiology facilitates great progress in aquaculture. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 493-497.

Tanaka, H., Nomura, K., Yamamoto, T. and Oku, H. (2006)  
Development of artificial diets and rearing systems for eel larvae -  
the first success of production of glass eel in captivity -. Bull.  
Fish. Res. Agen. Suppl. 5, 63-69. (in Japanese with English  
abstract)

田中秀樹 (2010) 完全養殖の成功と量産飼育の可能性 (特集 ウナギ  
種苗量産化への挑戦). 養殖, 47, 28-30.

Unuma, T., Hasegawa, N., Sawaguchi, S., Tanaka, T., Matsubara,  
T., Nomura, K. and Tanaka, H. (2011) Fusion of lipid droplets in  
Japanese eel oocytes: stage classification and its use as a biomarker  
for induction of final oocyte maturation and ovulation. Aquaculture  
322-323: 142-148

Unuma, T., Sawaguchi, S., Hasegawa, N., Tsuda, N., Tanaka, T.,  
Nomura, K. and Tanaka, H. (2012) Optimum temperature of rearing  
water during artificial induction of ovulation in Japanese eel.  
Aquaculture 358-359: 216-223

Unuma, T., Kondo, S., Tanaka, H., Kagawa, K., Nomura, K. and  
Ohta, H. (2004) Determination of the rates of fertilization, hatching  
and larval survival in the Japanese eel, *Anguilla japonica*, using  
tissue culture microplates. Aquaculture 241, 345-356.

Unuma, T., Kondo, S., Tanaka, H., Kagawa, K., Nomura, K. and Ohta, H. (2005) Relationship between egg specific gravity and egg quality in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 246, 493–500.

Yamamoto, T., Furuita, H., Matsunari, H., Sugita, T., Mineshima, F., Nakagawa, T. and Ishida, T. (2011) Effects of fortification of nutrients to female broodstock by diet alone and by both diet and direct injection on the egg quality of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Aquacult Sci* 59: 123–130

Yamamoto, K., Omori, M. and Yamauchi, K. (1974) Oogenesis of the Japanese eel. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 40, 9-15. (in Japanese with English abstract)

Yamamoto, K. and Yamauchi, K. (1974) Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in the aquarium. *Nature* 251, 220-222.

Yamauchi, K. (1990) Studies of gonadal steroids involved in final gonadal maturation in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Int Revue Ges. Hydrobiol.*, 74: 859-860.

Yamauchi, K., Nakamura, M., Takahashi, H. and Takano, K.  
(1976) Cultivation of larvae of Japanese eel. *Nature* 263, 412.

Yoshikawa, M. (2012) Improvement in hatching rates in the Japanese eel *Anguilla japonica* by the control of rearing temperatures in the late stage of maturation in the female parents. *Aquaculture* 338–341: 223–227

Yoshikawa, M. (1995) Relationships between gonadal maturity and body weight or age, and seasonal change of them in cultivated Japanese eel *Anguilla japonica*. *Bull. Shizuoka. Pref. Fish. Exp. Stn.*, 30, 23-27. (In Japanese)